

**Aplicació de cèl·lules
mare mesenquimals
per a la regeneració
de cartílag articular**

**Memòria per optar al grau de
Doctor en Biotecnologia de
DAVID PERIS PUCHOL
Setembre 2012**

UAB

**Universitat Autònoma
de Barcelona**





**Universitat Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

**APLICACIÓ DE CÈL·LULES MARE MESENQUIMALS PER A
LA REGENERACIÓ DE CARTÍLAG ARTICULAR**

Programa de doctorat en Biotecnologia.

Departament d'Enginyeria Química.

DAVID PERIS PUCHOL

Bellaterra, Setembre 2012

FRANCESC GÒDIA i CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, JORDI JOAN CAIRÓ i BADILLO, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JOAQUIM VIVES i ARMENGOL, Facultatiu del Banc de Sang i Teixits

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat David Peris Puchol ha dut a terme amb la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol: Aplicació de cèl·lules mare mesenquimals per a la regeneració de cartílag articular, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor en Biotecnologia.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, Setembre de 2012

Francesc Gòdia i Casablanca

Jordi Joan Cairó i Badillo

Joaquim Vives Armengol

ÍNDIX

ABREVIATURES	v
0. RESUM	1
1. INTRODUCCIÓ.....	5
1.1 La medicina regenerativa i les seves aplicacions en traumatologia.....	5
1.1.1 Estratègies per la regeneració de teixits	9
1.1.2 Component cel·lular	15
1.1.2.1 CMMA provinents de moll d'os.	20
1.1.2.2 CMMA provinents de cartílag hialí	23
1.1.2.3 CMMA provinents de greix.....	25
1.1.3 Biomatrius compatibles per a la regeneració de teixits	27
1.2 Tecnologia de cultiu	34
1.2.1 Medis de cultiu i additius.....	36
1.3 Perspectives d'aplicació.....	38
1.4 Cartílag	41
1.4.1 Estructura del cartílag articular sa.....	43
1.4.1.1 Condrocits.....	45
1.4.1.2 Matriu extracel·lular cartilaginosa	45
1.4.2 Maduració del cartílag.....	48
1.4.3 Degeneració del cartílag articular	49
1.4.3.1 Factors etiològics	50
1.4.3.2 Fisiopatologia.....	51
1.4.4 Autoreparació del cartílag articular	54
1.5 Teràpies establertes per la regeneració de cartílag articular	56
1.5.1 Noves aproximacions.....	60
1.6 Estudis preclínic.....	62

1.6.1	Models animals	66
1.6.2	Disseny experimental per a la regeneració de lesions osteocondrals.....	70
1.7	Bibliografia	75
2.	OBJECTIUS.....	85
2.1.	Objectius del treball	85
2.2.	Bibliografia	88
3.	CARACTERITZACIÓ DE CÈL·LULES MESENQUIMALS	90
3.1.	Aïllament i expansió de CMMA ovines	91
3.1.1	Protocol d'aïllament de CMN i CMMA.....	92
3.1.2	Caracterització de la cinètica de creixement de les CMMA provinents de moll d'os..	99
3.1.3	Caracterització de la cinètica de creixement de CMMA provinents de cartílag articular.....	108
3.1.4	Caracterització de la cinètica de creixement de les CMMA provinents de greix.....	111
3.1.5.	Caracterització de les CMMA mitjançant l'anàlisi de marcadors de superfície	115
3.1.6.	Avaluació de la multipotencialitat de CMMA derivades de moll d'os.....	117
3.2.	Expansió de CMMA humanes derivades de moll d'os, cartílag i greix.	122
3.3.	Alternativa al sèrum com a complement per al medi de cultiu per a CMMA humanes.....	125
3.3.1.	Estudi comparatiu de la utilització de sèrum FCS i AB en l'expansió de CMMA derivades de cartílag articular humà	127
3.4.	Bibliografia	133
4.	ESTUDI DE MATRIUS, COLONITZACIÓ I APLICACIÓ BIOMÈDICA.....	137
4.1.	Preparació de biopolímers	138
4.2.	Colonització de biopolímers amb CMMA provinents de cartílag articular	140
4.3.	Caracterització dels biopolímers	152
4.4.	Prova pilot per a la regeneració d'una lesió osteocondral generada artificialment mitjançant artroscòpia, en animal model	160
4.4.1	Resultats i discussió de l'experiment pilot.....	167
4.4.1.1.	Grup de lesió osteocondral tractada amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de cartílag articular hialí.....	175
4.4.1.2.	Grup de lesió osteocondral tractada amb biomatriu PLGA sense CMMA.....	179

4.4.1.3. Grup de lesió osteocondral control sense tractament	182
4.4.2. Conclusions de l'experiment pilot.....	185
4.5. Bibliografia	192
5. EXPERIMENT PRECLÍNIC PER A LA REGENERACIÓ DE DEFECTES OSTEOCONDRAIS.....	197
5.1. Assaig preclínic per a l'avaluació de CMMA de diferents orígens colonitzades en biomatrius de PLGA per a la regeneració de lesions osteocondrals en model oví	198
5.1.1. Aïllament, expansió i colonització de les CMMA.....	203
5.1.2. Anàlisi de resultats macroscòpics, histològics i de diagnòstic per imatge	211
5.1.2.1. Grup de lesió osteocondral control sense tractament	213
5.1.2.2. Grup de lesió osteocondral tractat amb biomatriu PLGA sense CMMA.....	217
5.1.2.3. Grup de lesió osteocondral tractat amb PLGA colonitzat amb CMMA provinents de cartílag articular	220
5.1.2.4. Grup de lesió osteocondral tractat amb PLGA colonitzat amb CMMA provinents de teixit adipós.....	225
5.1.2.5. Grup de lesió osteocondral amb PLGA colonitzat amb CMMA provinents de moll d'os.....	230
5.2. Conclusions	236
5.3. Bibliografia	245
6. CONCLUSIONS.....	249
7. MATERIALS I MÈTODES	254
7.1. Línies cel·lulars	254
7.1.1. Cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA)	254
7.1.1.1. Aïllament de CMMA procedents de moll d'os oví.....	257
7.1.1.2. Aïllament de CMMA procedents de cartílag articular oví o humà	258
7.1.1.3. Aïllament de CMMA procedents de teixit adipós oví	259
7.2. Manteniment de les línies cel·lulars	260
7.2.1. Congelació.....	261
7.2.2. Descongelació	262
7.2.3. Manteniment de les línies cel·lulars en cultius	263
7.2.4. Desadheriment de cultius de cèl·lules animals adherents	264

7.2.5.	Control de l'esterilitat dels cultius cel·lulars.....	265
7.3.	Medis de cultiu i sèrums	265
7.3.1.	Medi base de cultiu de cèl·lules mare mesenquimals adultes	266
7.3.2.	El sèrum, suplement de medis de cultiu per cèl·lules animals	266
7.3.2.1.	Extracció de sang	267
7.3.2.2.	Processament al laboratori	268
7.4.	Sistemes de cultiu de cèl·lules animals.....	269
7.4.1.	Sistemes comercials de cultiu estàtic	270
7.5.	Mètodes analítics	271
7.5.1.	Anàlisi de la concentració cel·lular.....	271
7.5.1.1.	Recompte directe	271
7.5.2.	Anàlisi enzimàtica de la glucosa i lactat	272
7.5.3.	Anàlisi genètica i histològica	273
7.5.3.1.	Purificació i quantificació del RNA total.....	273
7.5.3.2.	Reacció en cadena de la Polimerasa amb transcripció inversa prèvia (RT-PCR)	275
7.5.4.	Inclusió en parafina per histologia o criostat	277
7.5.5.	Hematoxilina-Eosina	277
7.5.6.	Histologia de Safranina O	278
7.5.7.	Immunohistoquímica per Col·lagen tipus II	279
7.5.8.	Anàlisi de la diferenciació condrogènica <i>in vitro</i>	280
7.5.9.	Citometria de flux.....	281
7.6.	Mesures fora de línia: creixements paral·lels.....	282
7.7.	Preparació de matrius de PLGA	283
7.7.1.	Colonització de matrius de PLGA	285
7.8.	Càlculs	286
7.8.1.	Avaluació de la regeneració de cartílag articular hialí	286
7.8.2.	Velocitat màxima de creixement i temps de duplicació	290
7.8.3.	Velocitats específiques de consum i producció de metabòlits	292
7.9.	Bibliografia	294
8.	ANNEXES.....	296
8.1.	Valoracions histològiques i macroscòpiques.....	296
8.2.	Bibliografia	300

ABREVIATURES

AEMPS: Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris

AH : Àcid Hialurònic

ARN: Àcid ribonucleic

Cc: Concentració cel·lular

cell: cèl·lules

CEEA: Comitè Ètic d'Experimentació Animal

CLD: Còndil Lateral Dret

CLE: Còndil Lateral Esquerre

CMD: Còndil Medial Dret

CME: Còndil Medial Esquerre

CMe: Cèl·lules Mare Embrionàries

CMMA: Cèl·lules Mare Mesenquimals Adultes

CMN: Cèl·lules Mononuclears

d: dies

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: *Dimethyl sulfoxide*

EMA: *European Medicines Agency* – Agència Europea del Medicament

ET: Enginyeria Tissular

FDA: *Food and Drug Administration*

GAG: Glucosaminoglicans

GMP: *Good Manufacture Practices* – Normes de Correcta Fabricació

h: hores

iPS: *Induced Pluripotent Stem Cell*

ICV: Integral de cèl·lules viables

ICRS: *Internacional Cartilage Repair Society*

IL-1: Interleuquina-1

KS: *Keratan Sulfate* – Queratan sulfat

MO: Moll d'os

N: Newtons

OA: Osteoartritis

OD: Osteocondritis Dissecans

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCL: *Poly-caprolactone* – Poli-caprolactona

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor* - Factor de creixement derivat de plaquetes

PEG: *Poly-ethylene glycol* – Poli-etilen glicol

PG: Proteoglicans

PGA: *Poly Glycolic Acid* – Àcid poli-glicòlic

PLA: *Poly Lactic Acid* - Àcid poli-làctic

PLGA: *Poly-(lactic-co-glycolic acid)* – Àcid poli-làctic-co-glicòlic

Q: Velocitat de consum o producció

RMN: Ressonància magnètica nuclear

rpm: revolucions per minut

RT-PCR: *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

STIR: *Short TI Inverse-Recovery*

TAC: Trasplantament Autòleg de Condròcits

TACAM: Transplantament Autòleg de Condròcits Assistit per Matrius

TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*

UAB: Universitat Autònoma de Barcelona

CAPÍTOL 0

RESUM

Les malalties articulars representen un problema de salut rellevant amb un prevalença molt alta (a Europa pot variar entre el 11% i el 25% de la població adulta) i que continua augmentant dia a dia en el món occidental, ja que no existeixen tractaments curatius. L'absència de tractaments, entre d'altres causes, provoca la cronificació d'aquestes malalties i l'aparició de problemes secundaris que afecten greument a la qualitat de vida de les persones que les sofreixen. Durant els últims anys, les cèl·lules mare mesenquimals adultes i les seves propietats regeneratives s'han estudiat intensament per trobar aplicacions factibles per a la cura d'aquestes malalties. La combinació d'aquestes cèl·lules amb materials sintètics, com els biopolímers, ha fet sorgir una nova branca mèdica, la medicina regenerativa. El potencial, tant econòmic com social, d'aquestes noves teràpies és molt alt. En el camp de la regeneració del cartílag articular fa uns anys que ja existeixen teràpies cel·lulars com el transplantament autòleg de condrocits o la mosaicoplàstia. Totes dues tècniques estan limitades per l'element regenerador (condrocits, periosti), les dificultats tècniques i les complicacions secundàries al tractament. És per aquestos motius que s'estan desenvolupant noves teràpies alternatives com la que es proposa en aquest treball.

El treball que es presenta a continuació aborda el desenvolupament d'una teràpia basada en la medicina regenerativa per a la regeneració de lesions osteocondrals, on el cartílag articular afectat no es pot reparar ni regenerar per si sol.

Aquesta memòria s'estructura, doncs, de manera que inicialment es fa una introducció (capítol 1), on es realitza una descripció exhaustiva del cartílag hialí, la seva estructura, fisiopatologia i les malalties que deriven de la seva degeneració. A més, es realitza una revisió dels diferents tractaments de les patologies osteocondrals, fent especial menció al transplantament autòleg de condrocits (TAC), descrivint-ne els avantatges i inconvenients. Finalment s'introdueix el concepte de la medicina regenerativa i la seva possible aplicació a la problemàtica traumatològica osteocondral actual, introduint els principals aspectes a tenir en compte sobre les cèl·lules, els biopolímers i les interaccions cèl·lula-polímer a nivell de senyalització molecular, els tres aspectes fonamentals d'aquestes noves teràpies.

Seguidament (capítol 2), es plantegen els principals objectius del treball. A continuació (capítol 3), es caracteritzen les fonts de cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) provinents de tres teixits diferents: cartílag hialí, moll d'os i greix. Es posen a punt els mètodes d'aïllament i expansió, i es realitza una caracterització de les cinètiques de creixement de les CMMA, s'analitza el fenotip, la fisiologia, la morfologia i la multipotencialitat. A més es comparen les morfologies durant l'expansió amb diferents sèrums com el fetal boví i l'autòleg preparat a partir d'extraccions de sang. En la major part de la caracterització s'utilitza un model animal oví, ja que en la discussió que es realitza en el capítol 1, es considera un model animal adient per a extrapol·lar els resultats d'una regeneració d'una lesió osteocondral.

En el capítol 4 es planteja un assaig preclínic per a la regeneració de lesions osteocondrals, en el model animal escollit, mitjançant un constructe format per CMMA i un polímer sintètic, l'Àcid poli-làctic-co-glicòlic (PLGA). El PLGA s'estudia en aquest capítol a nivell de porositat i la seva capacitat per ser colonitzat homogèniament per les CMMA. Un cop aconseguida la colonització es procedeix a la caracterització histològica i de degradació del PLGA. En el mateix capítol es posa a punt un experiment pilot de l'assaig preclínic on s'aïllen CMMA de cartílag hialí extret d'una ovella, s'expandeix, es colonitza en un cilindre de PLGA i es reintrodueix artroscòpicament a l'articulació femorotibial, on prèviament s'ha generat una lesió osteocondral artificial, per avaluar la possible regeneració o reparació amb els resultats macroscòpics, imatges de ressonància magnètica i histologia de les mostres.

Al capítol 5 es realitza un assaig preclínic, consistent amb un experiment similar amb totes les fonts de CMMA que s'han caracteritzat durant el treball (moll d'os, cartílag hialí i greix), amb un nombre superior d'animals i amb els temps d'estudi ampliat a 6 i 12 mesos. Es realitza el mateix anàlisi dels resultats que al capítol 4, amb una discussió sobre l'eficàcia i la seguretat del tractament desenvolupat per a la regeneració de lesions osteocondrals en model oví. Al capítol 6 es resumeixen les principals conclusions extretes del treball.

Finalment, es presenten els materials i mètodes emprats (capítol 7), i en l'apèndix (capítol 8), es recull informació detallada de l'avaluació dels resultats experimentals d'aquest treball.

CAPÍTOL 1

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La medicina regenerativa i les seves aplicacions en traumatologia

Segurament un dels referents més antics a la regeneració de teixits es pot trobar a la mitologia grega, amb la llegenda de Prometeu (figura 1.1), a qui Zeus va condemnar a que una àliga fes malbé el seu fetge devorant-lo dia a dia, però la immortalitat del tità li permetia regenerar el fetge i continuar vivint, posant de relleu les capacitats de regeneració inherents als teixits.



Figura 1.1 “El turment de Prometeu”. Peter Paul Rubens, 1614.

La introducció del mètode científic a la recerca, va significar un avanç en el coneixement de la biologia i les malalties. El concepte de la utilització d'un teixit com a reemplaçament d'un altre que ha perdut la seva funció va ser desenvolupat al segle XVI per Tagliazozzi, a Bologna, en el tractat de cirurgia *Decusorum Chirurgia per Insitionem*, on es descrivia la utilització d'un penjall de l'avantbraç com a substitut del nas (Lanza et al. 2007).

La tecnologia quirúrgica i el desenvolupament de la medicina regenerativa al segle XX han permès avançar significativament cap a la fabricació *de novo* de teixits funcionals que puguin substituir aquells que ja no es poden recuperar ni reemplaçar. Malgrat el gran avenç fet en la tecnologia del transplantament d'òrgans, aquest continua presentant severes limitacions que fan necessari el desenvolupament d'altres metodologies alternatives. Entre les complicacions que presenten els transplantaments es troben les infeccions intra i post-operatòries, la immunosupressió o l'aparició de processos neoplàsics.

L'enginyeria tissular és una àrea emergent que es va definir fa uns anys com "un camp interdisciplinari que aplica els principis de l'enginyeria i els de les ciències de la vida per al desenvolupament de substituents biològics que recuperin, mantinguin o millorin els teixits funcionals" (Vacanti et al. 1993). Els components clau per desenvolupar l'enginyeria tissular i la medicina regenerativa (figura 1.2) són les cèl·lules, els polímers, els factors de diferenciació i la combinació correcta de tots ells per generar el teixit desitjat.

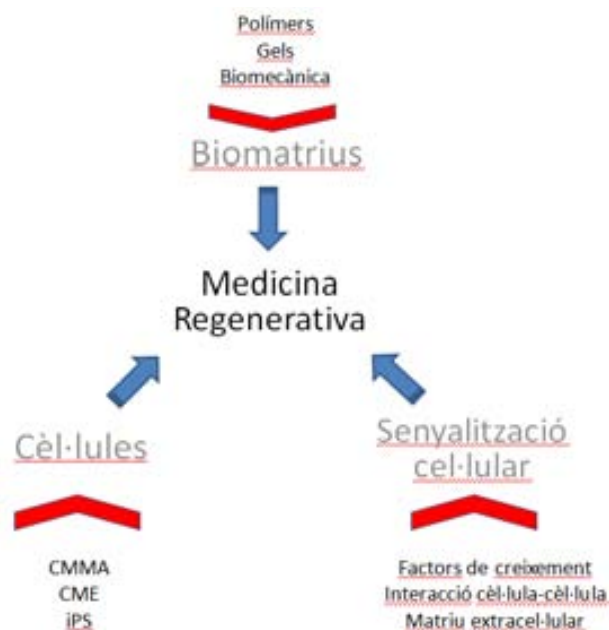


Figura 1.2 Els tres pilars de la medicina regenerativa. Els suports 3D (biomatrius), les cèl·lules i la senyalització cel·lular.

En el camp de les malalties musculoesquelètiques, durant els últims 30 anys hi ha hagut un avenç altament satisfactori en el tractament de les patologies, però continua havent-hi, per exemple, un 10% de pacients joves en els que no funcionen les pròtesis de genoll o fallen en el seguiment a llarg termini. Qualsevol tractament quirúrgic o ortopèdic persegueix l'objectiu de la restitució de la morfologia i funció originals del teixit afectat. L'enginyeria de teixits i la medicina regenerativa combinen aspectes de la biologia cel·lular, l'enginyeria, ciència de materials i cirurgia també amb l'objectiu final de la regeneració funcional del teixit (Goldberg et al. 2004).

Regeneració i reparació són dos processos fonamentalment diferents. La reparació fa referència al restabliment físic o mecànic dels teixits o òrgans danyats o malalts. En certes situacions, la reparació mitjançant teixit cicatricial, resultat de la reparació ràpida, pot funcionar satisfactòriament, com en les fases primerenques de la reparació òssia. Pel contrari, la regeneració és un procés relativament més lent que en última instància resulta en una duplicació biològica i funcional del teixit perdut. La regeneració és un procés que s'observa en infants, però rarament es troba en els adults (Caplan 1991).

La medicina regenerativa intenta assolir els següents objectius (Caplan 2003):

- Reposició física del teixit que manca amb un neoteixit biocompatible.
- Generació del neoteixit, no la reparació del teixit que manca.
- Regular i integrar el neoteixit al nínxol corresponent, restablint de forma natural la funció primària.

Aquest treball es centra en una determinada patologia, les lesions de cartílag articular, d'etiologia molt variada, i que actualment són un problema sense solució eficaç. Ja al 1743, William Hunter va afirmar "un cartílag ulcerat és un problema important, un cop destruït no es repara mai més" (Hunter 1743), i malgrat haver transcorregut quasi tres segles, l'afirmació continua sent vàlida. Les lesions de cartílag articular són freqüents a l'articulació del genoll, i si no es tracten poden tornar-se simptomàtiques i progressivament degenerar cap a artritis prematures o osteoartritis.

Les malalties de les articulacions afecten a més de 500 milions de persones arreu del Món (Diligence 2002). Aquestes tenen un denominador comú, les lesions generades al cartílag hialí durant el curs de la malaltia. Hi ha diferents tipus de lesions de cartílag, entre les que es troben les

derivades per traumatismes o les que deriven d'una degeneració progressiva pel desgast del temps o seqüeles de fractures. Aquesta última afectació s'anomena comunament Osteoartritis (OA) i és la principal malaltia implicada en les lesions de cartílag. S'estima que als EUA l'any 2005 hi havia 45 milions d'afectats. És difícil fer una estimació global degut a la diferent predisposició d'algunes ètnies a sofrir l'OA, però s'estima que l'any 2020 els afectats per OA superaran els 60 milions, aproximadament un 20% de la població total dels EUA (Insight 2003).

Una de les causes de l'OA en les articulacions és la degradació de la cavitat sinovial de l'articulació i en conseqüència, del cartílag articular. El fet de perdre la capacitat d'amortir les forces de cisalla del moviment articular causa una progressiva atrofia dels músculs adjacents. Les principals articulacions afectades són el genoll, l'espatlla, el maluc, etc. Altres factors que comporten OA són la predisposició genètica, desgast muscular, lesions esportives, fractures mal curades, obesitat, etc.

Altres malalties, com a conseqüència de la degeneració del cartílag hialí són els defectes osteocondrals, ja siguin derivats d'una patologia de base del pacient o d'un trauma sofert per aquest. Les lesions que destrueixen el cartílag articular poden esdevenir per traumatismes mecànics o degeneració mecànica progressiva. En els primers, un impacte directe o altres traumatismes poden lesionar el cartílag, i ocasionalment, un fragment de cartílag articular es separa de l'os subcondral subjacent. Aquest fragment s'anomena "cos lliure" i pot interferir amb la congruència i la funció normal de l'articulació afectada. En canvi, la degeneració mecànica evoluciona amb una pèrdua progressiva de l'estructura i la funció del cartílag articular provocant desgast i ruptures posteriors. Aquesta pèrdua inicial de cartílag evoluciona des d'un estovament cap a una fragmentació estructural del cartílag, fins a una alliberació de fragments macroscòpics de teixit cartilaginós, deixant al descobert l'os subjacent sense protecció per al desgast i les ruptures que diàriament minven la resistència i la congruència de l'articulació, degenerant en alguns casos cap a patologies com l'osteoartritis.

Els tractaments actuals disponibles es basen en pròtesis i implants tissulars, però aquests mètodes tenen diverses limitacions, com ara les infeccions associades a artroplasties totals i la baixa disponibilitat de donants compatibles. Aquests inconvenients han estimulat que la recerca es dirigeixi cap a mètodes funcionals de reemplaçament d'articulacions basats en la teràpia cel·lular o l'enginyeria de teixits.

1.1.1. Estratègies per la regeneració de teixits.

La regeneració de teixits implica la combinació de diferents àrees bàsiques i aplicades. La figura 1.3 representa el procés general que planteja la medicina regenerativa per a la regeneració de teixits.

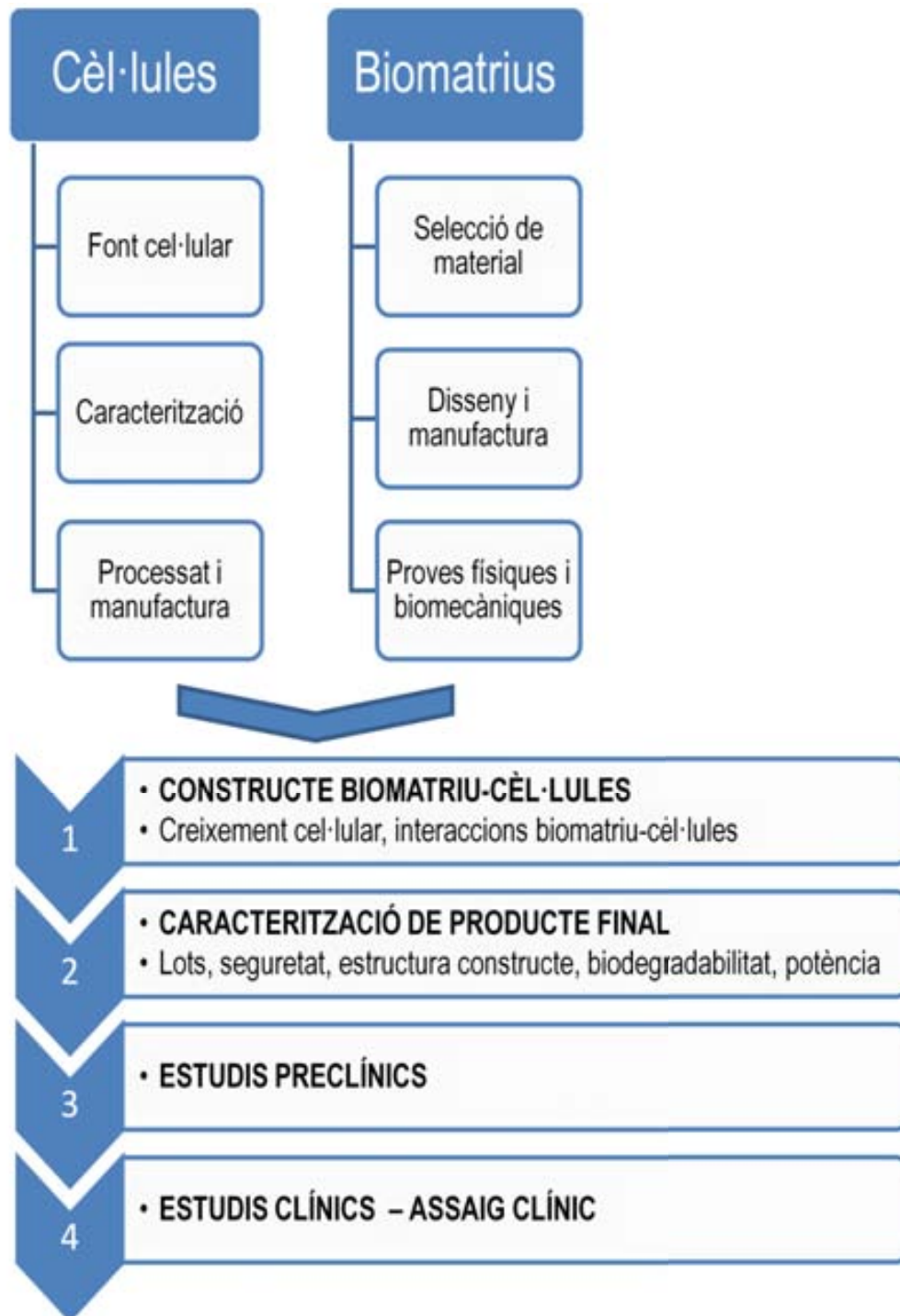


Figura 1.3 Procés global d'obtenció d'un producte destinat a teràpia cel·lular (adaptat de (Lee et al. 2010).

Per una part hi ha les cèl·lules, on cal escollir la font cel·lular, el seu origen, ja sigui autòleg o heteròleg, les característiques del donant i la biodisponibilitat. Per garantir el seu correcte ús, s'han de realitzar els perfils de proliferació i proves de contaminació de qualsevol de les línies cel·lulars amb les que es treballa. Aquestes línies cel·lulars, si han de ser per aplicació clínica humana, es recomana tenir un *stock* en un banc de cèl·lules per poder realitzar els tests requerits en qualsevol moment, com iniciar expansions cel·lulars paral·leles de seguretat. Aquesta estratègia s'utilitza generalment en línies cel·lulars heteròlogues. Un cop determinada la font cel·lular i conegudes totes les seves característiques, s'han de tenir en compte aspectes com el processat i la manufactura d'aquestes cèl·lules d'acord amb la reglamentació establerta per a l'ús de noves teràpies cel·lulars, que han de complir amb les Normes de Correcta Fabricació o *Good Manufacture Practice* (GMP) si es vol arribar a una producte d'aplicació en humans. Tot aquest procés de manufactura porta associat un registre i caracterització de lots on han de quedar determinades l'esterilitat, la puresa, la capacitat de proliferació i altres característiques essencials que defineixen el producte que s'ha generat (Lee et al. 2010).

Per una altra banda, l'altre component essencial en la medicina regenerativa són les matrius. De la biomatriu s'han de tenir en compte aspectes com la biocompatibilitat, la composició, la puresa, els contaminants, les propietats físiques i mecàniques, les característiques cinètiques de les cèl·lules en la matriu i l'esterilitat. El més important és la biocompatibilitat, definida com la propietat que implica l'absència d'interaccions no desitjades entre el material escollit i el teixit a regenerar. No han d'alliberar substàncies que generin una reacció adversa local o sistèmica, sent aquest un fet determinant per aquelles matrius reabsorbibles, dissenyades per a integrar-se al teixit durant la implantació. És important conèixer el perfil de reabsorció, la seva cinètica, el potencial de generar inflamació crònica o aguda. Existeixen guies elaborades per la *Food and Drug Administration* (FDA) per a fer els tests corresponents i assegurar la biocompatibilitat i bioseguretat necessària per la utilització de les matrius com a part d'un medicament per humans (FDA 1999).

De matrius biocompatibles comercials n'hi ha una gran varietat al mercat com les basades en proteïnes, carbohidrats, materials sintètics o fins i tot teixit humà processat. La selecció del material, el disseny i la fabricació contribueix a definir els paràmetres de la matriu que la faran funcionalment compatible amb el teixit que es vol regenerar.

De la mateixa manera que amb les cèl·lules, el disseny i la manufactura de les matrius juguen un paper important, sent la caracterització mecànica de les matrius un punt essencial per a la selecció d'un candidat. Cal realitzar proves adients per a la mesura de propietats com el mòdul elàstic, compressió/tensió, fatiga o abrasió, per a determinar l'ús clínic de les matrius.

Una de les dificultats que presenta la medicina regenerativa en l'avanç cap a la clínica és el desenvolupament de proves i la caracterització del constructe cèl·lula-matriu en un ambient apropiat, ja sigui *in vitro* o *in vivo*. Aquesta és una conseqüència directa de les característiques dels constructes, ja sigui per la seva complexitat tridimensional, l'heterogeneïtat de composició o la remodelació del constructe un cop implantat.

Els resultats obtinguts *in vitro* poden no ser completament indicatius sobre l'eficàcia i la seguretat clínica que tindran els constructes un cop estiguin implantats *in vivo*. Aquesta complexitat pot contribuir al fracàs durant el seu procés de desenvolupament i les proves clíniques. Quan el constructe final ha estat dissenyat i manufacturat, la seguretat i l'eficàcia són els paràmetres essencials. Per una part, s'avaluen la seguretat amb test de toxicitat, la presència de contaminació microbiana, la pirogenicitat o la presència d'endotoxines.

L'eficàcia es pot avaluar indirectament a través de la viabilitat cel·lular, les cinètiques de creixement, la potència del producte i la seva estabilitat, fent especial atenció a la capacitat de les cèl·lules per migrar cap al teixit hoste des de dintre del constructe, i la interacció entre la matriu i el teixit a regenerar. Per últim, com a qualsevol medicament, s'ha d'assegurar l'esterilitat de cadascun dels components del constructe, requerint-se, per tant, un procés d'esterilització que no alteri les característiques estructural i funcionals del constructe (Lee et al. 2010).

Una vegada completada la investigació *in vitro*, es passa a l'experimentació en animals model de laboratori, en el que s'anomena estudis preclínic. Aquests experiments *in vitro* han de permetre avaluar de forma positiva la seguretat i l'eficàcia del producte. Només aquells productes que permeten posar en evidència el benefici de la seva utilització en models animals representatius podran rebre l'autorització de les autoritats reguladores (FDA, EMA) per tal de passar a la següent etapa, els estudis clínics en humans.

Taula 1.1. Esquema del procés de desenvolupament d'un nou medicament des del seu descobriment fins a la comercialització (PhRMA 2006).

Estudis Preclínic		Estudis Clínics			FDA/EMEA	Fase IV
Anys	6,5	Fase I 1,5	Fase II 2	Fase III 3,5	1,5	COMERCIALIZACIÓ Avaluacions addicionals post- comercia- lització requerides per la FDA/EMA
Població estudiada	En el laboratori i estudis amb animals	20 a 100 voluntaris sans	100 a 500 pacients voluntaris	1000 a 5000 pacients voluntaris	Procés de <u>revisió/</u> <u>aprovació</u>	
Propòsit	Determinar la <u>seguretat</u> , <u>activitat biològica</u> i <u>formulació</u>	Determinar la <u>seguretat</u> i les dosis	Avaluar l' <u>efectivitat</u> i estudiar els efectes col·laterals	Confirmar l'efectivitat i controlar les <u>reaccions adverses</u> de l'ús a llarg termini		
Percentatge d'èxit	S'avaluen 5000 compostos	5 entren a estudis clínics			1 és aprovat	

A la figura 1.3, s'observen els 4 passos a seguir per tenir un producte basat en la medicina regenerativa al mercat, tota la fase de cribatge i caracterització prèvia a l'assaig preclínic en animals model, que formen part dels estudis preclínic. Els assajos clínics consisteixen en tres fases com es recull a la taula 1.1, on s'avalua la seguretat i la dosi a la fase I, l'eficàcia i els efectes secundaris a la fase II i l'efectivitat i els efectes adversos a llarg termini a la fase III. Superades amb èxit aquestes tres fases, el producte rep l'aprovació per a ser comercialitzat. Durant la comercialització el producte es troba permanentment en fase IV, una fase de farmacovigilància i avaluacions posteriors a la comercialització. El desenvolupament d'un fàrmac convencional s'estima entre 10-15 anys de durada i té un cost mitjà d'uns 800 milions de dòlars (TuftsCenter 2001).

Pel que fa a les teràpies cel·lulars, encara no es disposen de dades semblants, donat que el nombre de noves teràpies desenvolupades encara és molt reduït. Cal tenir en compte, també dins d'aquest context, que les expectatives generades en la població per aquestes noves teràpies, i l'absència de tractaments alternatius per una sèrie de malalties, pot fer escurçar en alguns casos el temps de desenvolupament.

Les característiques d'aquests productes i l'ambigüïtat de la legislació en aquell moment, va fer que Carticel® s'aprovés ràpidament, per part de la FDA (*Food and Drug Administration*), en comparació amb altres medicaments tradicionals. Des de l'aparició i aprovació de Carticel®, el primer producte fruit de les investigacions en el camp de la medicina regenerativa, l'any 1997, s'han desenvolupat moltes altres teràpies per a diferents aplicacions. La FDA va aprovar posteriorment altres teràpies per al tractament de grans cremats com Epicel™, Dermagraft®, Transcyte® o Apligraf® (Hentze et al. 2007).

La ràpida progressió en el camp de la medicina regenerativa i l'enginyeria tissular, l'aparició d'una gran varietat d'aplicacions terapèutiques i les expectatives generades, va fer que les diferents institucions, tant europees com d'EUA, haguessin d'adaptar la legislació a aquests nous tractaments. En el cas europeu no va ser fins el novembre de 2007 quan finalment es va aprovar el reglament 1394/2007 (2007) que regula els medicaments de les teràpies avançades, modificant i ampliant la directiva 2001/83/CE que estableix un marc comú per a la regulació del medicament per ús humà. Actualment es considera que un medicament de teràpia avançada inclou:

- Medicaments de teràpia gènica.

- Medicaments de teràpia cel·lular somàtica.

- Productes d'enginyeria tissular.

Com a producte de medicina regenerativa s'entén tot aquell que està format per cèl·lules o teixits manipulats per enginyeria i el qual té unes propietats determinades que permeten, si s'administra a persones, regenerar, restaurar o reemplaçar un teixit humà. El producte pot contenir cèl·lules o teixit d'origen humà, animal o ambdós. Les cèl·lules o teixits poden ser viables o no i poden contenir substàncies com biomolècules, biomaterials, suports o matrius. Queden excloses d'aquesta definició aquelles cèl·lules que no estiguin manipulades i que no s'hagin fet canviar les seves característiques biològiques, funcions fisiològiques o propietats estructurals per a la regeneració. Certes manipulacions sí són permeses, com la centrifugació, el filtrat, la separació, la concentració, la purificació cel·lular, la congelació o la criopreservació, entre d'altres. És a dir, unes cèl·lules autòlogues extretes del pacient i que no passin per cap manipulació no llistada a l'annex I del reglament 1394/2007, no es consideren medicaments avançats i no se'ls hi aplica la legislació

pertinent. En el cas de produir-se certes manipulacions com l'aïllament, expansió i colonització en una biomatriu, fan que en una possible aplicació humana, aquest producte sigui considerat com un medicament de teràpia avançada, i el seu desenvolupament haurà d'acomplir amb tots els requisits i passar totes les fases, tant clíniques com preclíniques.

Com a tot medicament, per poder ser aprovat per les autoritats sanitàries, la EMA (*European Medicines Agency*) a nivell europeu, la AEMPS (Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris) a nivell espanyol i la FDA a nivell americà obliguen a passar proves clíniques, en un procés que implica 4 fases ja descrites anteriorment.

La directiva 2009/120/CE estableix el marc comú sobre medicaments per a ús humà pel que fa als medicaments de teràpies avançades, establint nous punts crítics que s'han d'avaluar en el productes basat en la medicina regenerativa prèviament a la seva utilització en humans, on un requisit que es demana són proves preclíniques, ja siguin *in vivo* o *in vitro*, sobre la seguretat i l'eficàcia del tractament que s'està desenvolupant.

S'han discutit durant els últims anys els diferents aspectes més rellevants per poder portar més ràpidament les teràpies en desenvolupament cap al mercat, és a dir, disminuir el temps global del procés d'obtenció d'un nou medicament. Els següents aspectes es consideren clau en el desenvolupament d'un producte basat en medicina regenerativa (Johnson et al. 2007):

- Aspectes relacionats amb la interacció que es produeix entre el producte i el teixit a regenerar i les conseqüències clíniques.
- Manufacturat i escalat.
- Font cel·lular i caracterització cel·lular i tissular.

Entre d'altres aspectes, els experts valoren també la multidisciplinarietat, les repercussions clíniques, el control de l'angiogènesi, el comportament immunològic, la biologia molecular i la ciència de biomaterials entre d'altres.

1.1.2. Component cel·lular.

Les cèl·lules són un dels tres components clau de la medicina regenerativa. Tot i que alguns estudis han aconseguit obtenir regeneració només basant-se en la utilització de matrius sense cèl·lules, també s'ha observat que la introducció de cèl·lules accelera la regeneració *in vitro* i *in vivo*. A més, aquestes cèl·lules implantades s'integren al teixit, sense ser reemplaçades per les cèl·lules hoste del teixit a reparar (Tatebe et al. 2005). S'han realitzat estudis amb una àmplia gamma de tipus cel·lulars, però el que més s'ha utilitzat fins ara en la recerca i en la clínica de l'enginyeria de cartílag ha estat el condrocit autòleg (Athanasίου et al. 2009). Les cèl·lules s'extrauen del mateix pacient, evitant així, total o parcialment, una resposta immune indesitjada.

En alguns casos en que el cartílag donant no es troba en condicions òptimes o la disponibilitat no és suficient, s'ha postulat obtenir les cèl·lules d'una font heteròloga o xenogènica. Els problemes que presenta el trasplantament heteròleg són els d'immunogenicitat, transmissió de malalties o la limitació de la disponibilitat a l'espècie humana. S'han realitzat xenotransplants entre animals, obtenint resultats prometedors en ovella (Homminga et al. 1991) i conills (Toolan et al. 1998), encara que han presentat les mateixes dificultats que els al·logènics, a més de les possibles complicacions que es poden donar pel creuament d'espècies, compatibilitat immunològica, cel·lular o molecular i malalties.

Existeix la disjuntiva entre la utilització de les aproximacions heteròloga i autòloga. Ja s'han comentat els problemes que presenten les cèl·lules heteròlogues, principalment, rebuig immunitari i transmissió de malalties. Entre els avantatges que presenten es troben la major disponibilitat, a l'haver-hi donants. En general, i també en aquest treball, s'està treballant més per desenvolupar la tecnologia autòloga, per evitar qualsevol problema derivat de les transmissions de gèrmens o el rebuig immunològic.

D'entre les cèl·lules humanes que es poden utilitzar es troben les cèl·lules mare embrionàries (CMe). Les CMe deriven de la massa cel·lular interna de l'embrió en estadi de blastòcit (7-14 dies). Una altra característica, important per a la seva utilització en medicina regenerativa, és la necessària diferenciació *in vitro* cap al llinatge cel·lular desitjat. La seva utilització fa anys que està postulada per a la regeneració de teixits donada la seva pluripotencialitat. Presenten, però alguns problemes (Malgieri et al. 2011):

- El rebuig del teixit trasplantat (provinents d'embrions de donants).
- El risc de formació d'un teratoma residual a causa de remanents de cèl·lules indiferenciades.
- La dificultat per obtenir un nombre de cèl·lules suficients per a teràpia i la qualitat del procés de producció.

Aquests problemes s'estan intentant solucionar, però en presenten d'altres com els problemes ètics derivats de la utilització d'embrions humans, no acceptada de forma general, i de fet prohibida en alguns països, les vies de diferenciació desconegudes i possibles reaccions immunogèniques per ser una font al·logènica. De fet, la FDA va autoritzar l'any 2009 el primer assaig clínic en humans basat en una teràpia cel·lular de CMe per a pacients accidentats i lesionats de medul·la espinal, producte desenvolupat per la empresa Geron sota l'acrònim GRNOPC1 (Geron 2009). A la vista dels primers resultats preliminars, després de la injecció de 2 milions de CMe, la teràpia es mostra segura i sense efectes adversos atribuïbles al producte cel·lular (Geron 2011a). Malgrat aquests primers resultats, l'assaig clínic ha estat recentment abandonat per la empresa, adduint aquesta motius econòmics (Geron 2011b).

Recentment s'ha desenvolupat el que podria ser un nou tipus de font cel·lular, les iPS (induced Pluripotent Stem Cell), cèl·lules mare pluripotents induïdes mitjançant l'expressió exògena de certs gens que controlen la pluripotència com Oct4, Sox2 (Yamanaka et al. 2008). Se'ls hi suposa el mateix potencial que les CMe sense presentar els problemes d'immunogenicitat (Mauritz et al. 2008). Fins al moment, no s'han realitzat assaigs *in vitro* ni *in vivo* per a la regeneració de cartílag amb iPS.

Una segona font cel·lular a considerar són les cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) que no presenten els problemes de les CMe i semblen tenir moltes possibilitats en el camp de la medicina regenerativa del cartílag. Algunes de les fonts de CMMA més estudiades han estat les de greix, pell, cartílag i les que es consideren el "*gold standard*" o cèl·lules de referència, les provinents del moll d'os (Pittenger et al. 1999). Si les cèl·lules són autòlogues es minimitzen els problemes d'immunogenicitat que poden existir. Aquestes cèl·lules presenten una capacitat de proliferació elevada, així que depenent del teixit, les biòpsies poden ser més o menys considerables. Presenten el problema de la comorbiditat i el dolor causat per la biòpsia, però, en

funció del teixit i de la zona, pot esser mínim com en el cas de les CMMA derivades de teixit adipós.

Vist que existeixen diferents tipus de cèl·lules mare, és important remarcar que en aquest treball s'utilitzen només les CMMA. De forma introductòria, es llisten la gran varietat de models estudiats durant les últimes dècades, derivats de diferents teixits, ja sigui el moll d'os, múscle, cartílag, fetge, cervell, cordo umbilical i altres (Taula 1.2).

Taula 1.2. Multipotencialitat de les CMMA (Atala 2008).

Fonts de Cèl·lules Mare Mesenquimals Adultes (CMMA) multipotencials

Teixit	Potencial diferenciador
Moll de l'os	Condròcit, Astròcit, Cardiomiòcit, Adipòcit, Hepatòcit, Cèl·lula mesangial, Osteoblast, Estroma, Múscul, Neurona
Múscul	Adipòcit, Condròcit, Osteòcit, Neurona
Os trabecular	Adipòcit, condrocit, osteoblast
Dermis	Adipòcit, condrocit, osteoblast, múscul
Teixit adipós	Condròcit, estroma, osteoblast, múscul
Periosti	Condròcit, osteoblast
Membrana sinovial	Adipòcit, condrocit, múscul, osteoblast
Sang	Adipòcit, fibroblast, osteoblast, osteoclast

A diferència de les CMe, les CMMA no presenten problemes ètics i regulatoris, i permeten la utilització de teràpies autòlogues personalitzant el tractament, evitant problemes de rebuig immunològic. Els diferents tipus de CMMA presenten característiques i dificultats en comú. Es troben en un nombre molt baix en el cos i disminueixen amb l'edat, i per tant la seva utilització requereix una expansió *ex-vivo*, on les tecnologies de cultiu tot just s'estan desenvolupant en l'actualitat per fer front a aquestes necessitats.

Les CMMA es troben en la majoria de teixits i òrgans de l'organisme i actuen com a sistema de reparació del cos, substituint les cèl·lules especialitzades i, alhora, mantenint el procés de regeneració de certs òrgans, com la sang, la pell o l'os. La majoria de les CMMA són restringides a llinatge i per tant, són multipotents i no totipotents.

A la medul·la òssia humana es poden diferenciar dos tipus de poblacions de cèl·lules mare adultes: les cèl·lules mare hematopoètiques, responsables del manteniment de la producció de les

cèl·lules sanguínies al llarg de la vida; i les cèl·lules mare mesenquimals (CMM), responsables dels teixits no hematopoètics. A la figura 1.4 es troben representats els diferents llinatges o teixits cap als quals es poden diferenciar les cèl·lules mesenquimals.

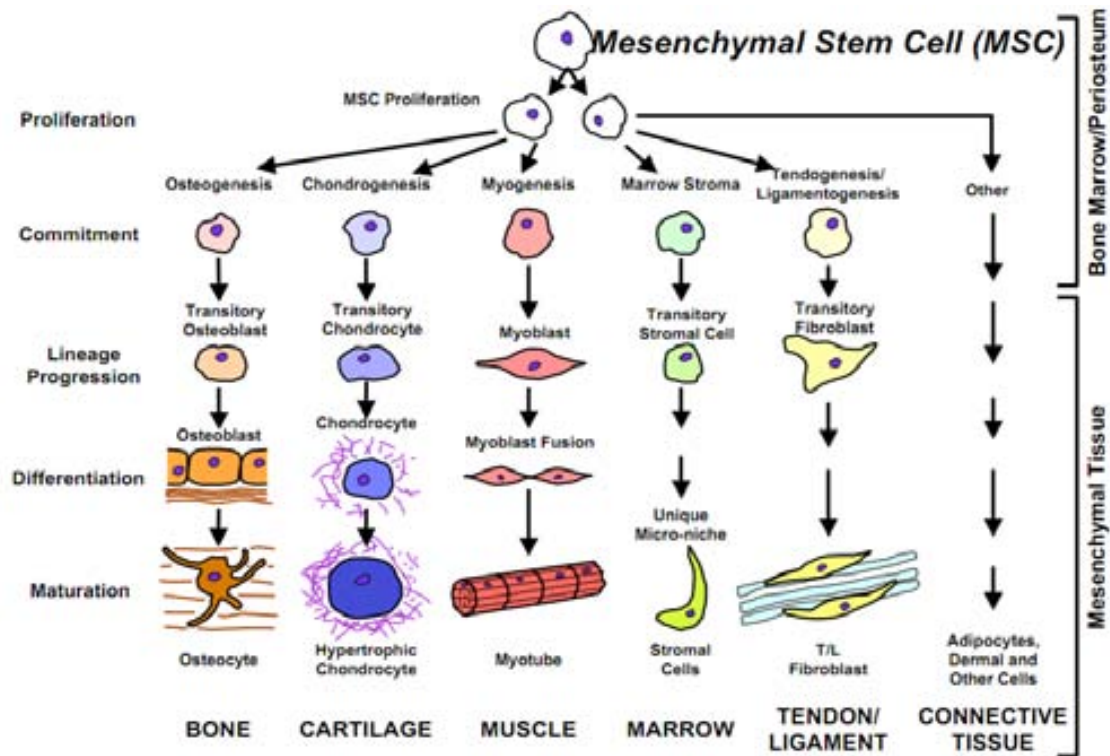


Figura 1.4. Les cèl·lules mare mesenquimals i la seva diferenciació a diversos llinatges cel·lulars. (Caplan 2005)

Les CMM van ser descrites per primer cop per Friendstein i col·laboradors al 1966 (Friedenstein et al. 1966) com a una població de cèl·lules adherents, de morfologia fibroblàstica i amb capacitat osteogènica. S'ha vist que aquestes cèl·lules posseeixen la capacitat per diferenciar-se cap a diferents llinatges cel·lulars, incloent cartílag, os, greix, múscul i tendó.

L'interès biològic i clínic per les CMMA ha anat augmentant al llarg de les últimes dues dècades, tal i com indica el nombre de publicacions referides a aquestes cèl·lules, les tecnologies associades i els equips d'investigació que es dediquen a l'estudi d'aquestes cèl·lules. No obstant, el concepte de cèl·lula mare mesenquimal i la seva definició morfològica, molecular o fisiològica

continua sent una incògnita, ja que no es disposa de cap marcador específic que caracteritza inequívocament aquesta cèl·lula. S'apliquen diferents protocols a l'aïllament i l'expansió de cèl·lules mare mesenquimals, fet que pot comprometre la reproductibilitat dels experiments i la comparació de resultats entre els diferents assaigs de medicina regenerativa que s'estan realitzant. En aquest context, la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) va acordar que la nomenclatura correcta per a les cèl·lules adherents aïllades del moll d'os i altres teixits que tothom anomenava cèl·lules mare mesenquimals (*mesenchymal stem cells*), passessin a anomenar-se "cèl·lules estromals mesenquimals multipotents" (Horwitz et al. 2005). En aquest treball, aquest tipus de cèl·lules s'anomenen cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) ja que inicialment es van descriure com una de les poblacions de les cèl·lules mare adultes del moll d'os, i posteriorment s'ha vist que aquest tipus de cèl·lules es poden trobar en diferents teixits com el cartílag, l'os, la pell i d'altres (taula 1.3).

Taula 1.3. Principals fonts cel·lulars descrites a la bibliografia de cèl·lules mare mesenquimals adultes a l'humà.

Font cel·lular de CMMA	
Teixit	Referències més representatives
Moll d'os	(Friedenstein et al. 1966; Pittenger et al. 1999)
Os	(Tuli et al. 2004)
Múscul	(Young et al. 2001)
Adipós	(HUANG et al. 2001)
Cartílag articular	(Tallheden et al. 2003)
Pell	(Toma et al. 2001)
Sang perifèrica	(Kuznetsov et al. 1997)

Pel que fa a la definició biològica de CMMA, l'ISCT proposa una sèrie de característiques que s'han d'acomplir per definir una cèl·lula humana com a mare mesenquimal a nivell de recerca (Dominici et al. 2006). Els criteris per definir les CMMA són:

1. Adherència al plàstic.

Les cèl·lules han de presentar adherència al plàstic i créixer sobre el mateix.

2. Expressió antigènica de superfície característica.

La població cel·lular ha de mostrar un fenotip, en més del 95% de la població, positiu per a CD105, CD44, CD73, CD90, i en menys del 2%, positiu per a CD45, CD34, CD14, HLA-DR, és a dir, l'absència d'aquests darrers marcadors.

3. Multipotencialitat.

És necessari que les cèl·lules presentin la capacitat de diferenciar-se cap a diferents llinatges tals com l'osteogènic, el condrocitari o l'adipocitari.

A continuació es descriuen algunes de les fonts de les quals es poden extreure CMMA i les aplicacions clíniques que es troben comercials o en fase de desenvolupament per a cadascuna de les fonts que s'estudien en aquest treball: moll d'os, cartílag i greix.

1.2.1.1. CMMA provinents de moll d'os.

Les CMMA són una de les poblacions de CMM que presenta el moll d'os, aïllades originalment de l'estroma del moll de l'os, que és la regió no hematopoètica del teixit. Les CMMA es troben presents en una proporció molt baixa, al voltant d'un 0.01-0.001% de les cèl·lules nucleades del moll de l'os (Pittenger et al. 1999). S'han desenvolupat diversos protocols d'aïllament durant les últimes dècades. Les cèl·lules poden ser aïllades mitjançant un simple cultiu en placa del moll d'os, permetent l'adherència de les CMMA, encara que el protocol més freqüent que s'utilitza és l'aïllament de les CMMA mitjançant una centrifugació amb gradient de ficoll o percoll, on la fina capa de cèl·lules mononucleades (CMN) que s'obté, es cultiva en un placa de cultiu. Amb el temps, els recanvis de medi, i la utilització de determinats sèrums per suplementar els medis permeten que apareixin petites colònies de cèl·lules adherents fibroblàstiques que corresponen a les CMMA. S'han desenvolupat mètodes per purificar aquestes cèl·lules amb citometria de flux (FACS, MACS), on el mètode es basa en la selecció positiva de marcadors que s'expressen a les CMMA, comentats anteriorment, encara que no són exclusius.

S'ha descrit que les CMMA, un cop diferenciades, poden desdiferenciar-se, de manera que tornen al seu estat mesenquimàtic multipotent, i transdiferenciar-se cap a un altre teixit (Song et al. 2004). La seva capacitat per diferenciar-se a diferents teixits i l'habilitat d'acumular-se en llocs amb dany tissular, fan d'elles unes excel·lents candidates per a ser utilitzades en medicina regenerativa. Aquestes cèl·lules s'utilitzen també en tractaments de rebuig per evitar respostes autoimmunitàries durant els transplants, ja que tenen una funció immunosupressora (Le Blanc et al. 2004), o la regeneració de diferents teixits mesenquimàtics com l'os (Horwitz et al. 2001).

Actualment es desconeix quin és el paper específic d'aquestes cèl·lules en els processos de regeneració tissular, però se sap que el seu efecte pot estar mediat o pot ser degut a la seva habilitat de secreció de factors que potencien la regeneració de les cèl·lules danyades, a l'estimulació de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules troncales progenitors endògenes presents en la majoria de teixits (Lee et al. 2006), a la inducció de l'angiogènesi (Wu et al. 2007), a la disminució de les reaccions immunològiques i inflamatòries (Ortiz et al. 2007) i, potser també, a la reducció de l'apoptosi (Hung et al. 2007). Per tant, és l'alteració del microambient per part d'aquestes cèl·lules el que contribueix a la reparació tissular efectiva i no només la seva capacitat de proliferació i diferenciació (Phinney et al. 2007). Aquesta és la font més utilitzada en la recerca bàsica de CMMA en comparació amb altres fonts. A més, la seva bioseguretat ha estat demostrada en cèl·lules provinents de moll d'os humà. Aquestes cèl·lules no presenten fenòmens de transformació tumoral, ni malformacions cromosòmiques, i mantenen la morfologia i el fenotip al llarg de la seva expansió, fins a 25 ressembres, o el que podria ser equivalent a una expansió de 44 setmanes (Bernardo et al. 2007).

L'any 1995 l'equip del Dr. Caplan va ser el primer en introduir CMMA autòlogues expandides *ex-vivo* en pacients amb diferents malalties hematològiques (Lazarus et al. 1995) establint així el primer assaig clínic amb CMMA provinents de moll d'os. Des d'aquell moment fins a l'actualitat la majoria d'assaigs clínics que s'estan portant a terme a l'àrea de la medicina regenerativa i la teràpia cel·lular, es fa amb CMMA provinents de moll d'os (Jeffrey 2010). A la taula 1.4 es resumeixen els diferents assaigs clínics que s'estan portant a terme en l'actualitat per al tractament dels defectes osteocondrals o la prevenció i cura de malalties relacionades amb el cartílag articular com l'osteoartritis i la gonartrosis.

Taula 1.4. Assaigs clínica que utilitzen com a font cel·lular CMMA d'origen moll de l'os. *Referència d'identificació d'assaig clínic a la web <http://clinicaltrials.gov>

Tipus de lesió	Disseny	Estatus	Referència
Defectes osteocondrals	CMMA + Biomatriu Col·lagen tipus I	Fase I	NCT00850187*
Defectes osteocondrals (1-16 cm ²)	<i>Pellet</i> de CMMA recobert per capa de periosti	Fase clínica II-III	NCT00891501*
Defectes osteocondrals (1-6 cm ²)	CMMA de dues fonts(moll d'os i cartílag hialí)+ Biomatriu	Fase clínica I	NCT00885729*
Defectes osteocondrals (1-6 cm ²)	CMMA no expandides + Biomatriu Hidroxiapatita-Col·lagen	Fase clínica I	NCT01159899*
Osteoartritis	Injecció intra-articular de CMMA	Fase clínica I	NCT01207661*
Osteoartritis	Injecció intra-articular de CMMA	Fase clínica I-II	NCT01183728*
Gonartrosis	Injecció intra-articular de 40E+06 CMMA	Fase clínica I	NCT01227694*

Les estratègies que plantegen els diferents investigadors i les empreses que promouen els assaigs clínics es basen amb injeccions intra-articulars de dosis de CMMA fins a 40E+06 cèl·lules. En el cas del defectes osteocondrals s'utilitzen les CMMA en combinació amb diferents biopolímers o un recobriment de periosti similar al que es realitza en la tècnica del TAC. No existeix cap tractament autoritzat per ninguna autoritat de seguretat mèdica o farmacèutica internacional per a la regeneració de defectes osteocondrals basat en CMMA provinents de moll d'os.

En un model *in vivo* d'osteoartritis, Murphy i col·laboradors van demostrar que la injecció intra-articular de CMMA provinents de moll d'os podia regenerar ruptures parcials de menisc i afavoria la prevenció de la degeneració de l'articulació prevenint l'osteoartritis (Murphy et al. 2003). Amb aquests resultats, la companyia nord-americana *Osiris Therapeutics* inicià el 2006 un assaig clínic fase I/II (referència en clinicaltrials.gov: NCT00225095) per avaluar la seguretat i l'eficàcia del tractament basat en CMMA al·logèniques de moll d'os de donants, suspeses en una solució d'àcid hialurònic (Chondrogen®), per a la reparació i regeneració de menisc. Els pacients tractats amb Chondrogen van presentar regeneració de menisc front als qui se'ls va administrar placebo i, com a mínim, durant un any es va mantenir la superfície articular sana amb la degeneració de l'articulació disminuïda respecte als pacients control. Aquest assaig va finalitzar el 2008 i llavors es va iniciar un seguiment clínic i patològic de 3 anys per assegurar l'eficàcia i la seguretat del tractament (referència en clinicaltrials.gov: NCT00702741) i les diferents dosis administrades als pacients, entre 50 i 150 milions de CMMA al·logèniques provinents de moll d'os. Aquest

representa un dels exemples de teràpia cel·lular més avançada en la fase de desenvolupament a l'àrea de l'ortopèdia i traumatologia, encara que existeixen altres casos com l'empresa *Regenexx* on s'han tractat ja més de 227 pacients amb problemes ortopèdics sense haver completat els diferents assaigs clínics i totes les fases de desenvolupament que exigeix la legislació americana. En aquest cas, les CMMA són provinents de moll d'os i expandides *ex-vivo* amb un medi de cultiu complementat amb llistat de plaquetes autòleg (Centeno et al. 2010). Aquesta activitat no ha passat desapercibuda per les autoritats i l'agència reguladora corresponent, la FDA, no ha autoritzat la comercialització i la realització de més tractaments en humans fins que no es demostrin els criteris de seguretat i eficàcia en un assaig clínic controlat (Centeno et al. 2011).

1.2.1.2. CMMA provinents de cartílag hialí.

Des de fa més de dues dècades es coneix l'existència de cèl·lules progenitores al cartílag hialí, on resideixen cèl·lules similars a les CMMA (Young et al. 1995). Donat que el teixit d'interès en aquest treball és el cartílag i donada l'existència d'una població de condrocits que presenta unes característiques immunofenotípiques molt similars a les CMMA derivades de moll d'os, adherents i multipotents (de la Fuente et al. 2004), aquesta és una de les fonts escollides en aquest treball.

Diferents estudis mostren la capacitat d'aquests condrocits de regenerar cartílag hialí un cop han estat desdiferenciats i implantats de nou, no només en humans (Wang et al. 2006), sinó en altres espècies com els conills (Deng et al. 2002) o les ovelles (Guo et al. 2004).

Actualment la majoria dels tractaments per a les lesions osteocondrals estan basades en una combinació de condrocits amb alguna espècie de suport, ja sigui una capa de periosti que recobreixi la solució de condrocits (Carticel®) o una matriu que contingui aquestes cèl·lules. A la taula 1.5 es resumeixen alguns dels tractaments actuals que existeixen i es detalla el disseny i l'estratègia que es segueix en cada cas per regenerar la lesió osteocondral.

Taula 1.5 . Productes per a la regeneració de lesions osteocondrals, comercialitzats i en fase d'assaigs clínic, que utilitzen com a font cel·lular CMMA d'origen cartílag articular. *Referència d'identificació d'assaig clínic a la web <http://clinicaltrials.gov>

Producte/Empresa	Disseny	Estatus	Referència
Carticel/ <i>Genzyme</i>	12E+06 CMMA/vial	Comercialitzat	www.genzyme.com
MACI/ <i>Genzyme</i>	15-10E+06 CMMA en matriu de col·lagen tipus I/III. Cultiu durant 4 setmanes	Fase III	NCT01251588
ChondroCelect/ <i>TiGenix</i>	TAC amb 0.8-1.0 CMMA/cm ³ d'extensió de la lesió	Fase III/ Comercialitzat a Europa	NCT00414700*
Chondrotransplant/ <i>Co.don</i>	TAC	Fase II	NCT01225575*
Chondrosphere/ <i>Co.don</i>	Generació de microesferes amb les CMMA expandides	Fase III	NCT01222559*
Bioseed-C/ <i>BioTissue technologies</i>	CMMA en matriu de Polyglactin/poly-p-dioxanon	Comercialitzat en Alemanya	http://www.biotissue.de
Biocart II/ <i>Prochon</i>	CMMA en matriu d'Àcid hialurònic+fibrina. Cultiu durant 2-4 setmanes amb FGF i sèrum humà.	Fase clínica II/ Comercialitzat a Israel	NCT00729716 *
CaReS/ <i>ARS Arthro AG</i>	20E+06 CMMA en matriu de col·lagen tipus I. Cultiu durant 14 dies.	Comercialitzat a Alemanya i Turquia.	http://www.arsarthro.com.tr
Chondron/ <i>Cellontech Co</i>	TAC amb >12E+06 CMMA per cada 0.4mL	Fase I	NCT01218945*
Cartipatch/ <i>TBF Genie Tissulaire</i>	CMMA en hidrogel d'agarosa-alginat	Fase III	NCT00945399*
ChondroArt 3D/ <i>Educell</i>	CMMA en hidrogel d'agarosa-alginat	Comercialitzat a Eslovènia	http://www.educell.si

Fins al moment, l'únic tractament que es comercialitza a tot el món, i ha superat la fase III, és Carticel®. La resta de tractaments esmentats a la taula 1.5. es troben en fase d'investigació o es practiquen només als països on s'han desenvolupat sota les legislacions del país corresponent. En aquest treball es proposa una estratègia de regeneració de cartílag articular que incorpora les matrius tridimensionals com a suport estructural per a les CMMA. Existeixen encara algunes companyies que desenvolupen el Trasplantament Autòleg de Condròctis (TAC) com *TiGenix* (ChondroCelect®, aprovat per la EMA a l'octubre de 2009) o *Cellontech* (Chondron®), però la majoria de les que es mostren a la taula 1.5. es troben desenvolupant algun tipus de variant de Trasplantament Autòleg de Condròcit Assistit per Matriu (TACAM), on els diferents suports van des de esponges de col·lagen tipus I, col·lagen tipus I/III, hidrogels d'agarosa-alginat o polímers sintètics (Bioseed-C®).

1.2.1.3. CMMA provinents de greix.

El teixit adipós, així com la medul·la òssia, deriva de la mesènquima i conté estroma de suport que s'aïlla de manera fàcil. Entre l'esmentat estroma es troben les CMMA derivades de teixits adipós, que tenen un potencial multilinatge molt similar al de les cèl·lules de la medul·la òssia (Musina et al. 2005). Els avantatges d'aquestes cèl·lules són la seva fàcil obtenció per mètodes menys invasius que els d'obtenció en d'altres teixits, mitjançant una escissió local o una liposucció, i la seva gran abundància, ja que la concentració de les CMMA en el teixit adipós és un ordre de magnitud més elevat que les CMMA al moll d'os (Huang et al. 2001). Tanmateix poden arribar a presentar inconvenients com la transformació cel·lular, en aquest cas si s'han trobat indicis de reordenaments cromosòmics, o la immortalització de les línees cel·lulars durant l'expansió *ex-vivo*. Per tant requereixen de controls per comprovar la bioseguretat de la seva utilització com a part de la teràpia cel·lular (Rubio et al. 2005).

S'ha vist que factors com l'edat, el tipus de teixit adipós (blanc o marró), la localització d'aquest teixit (subcutani o visceral), el tipus de cirurgia emprada, les condicions de cultiu, l'exposició al plàstic, la densitat de sembra i el medi de cultiu utilitzat poden influir tant en la proliferació com en la capacitat de diferenciació de les CMMA provinents de greix (Schäffler et al. 2007). No s'ha descrit a la bibliografia una font de CMMA d'origen adipós a l'espècie ovina, però sí ha estat descrita en humans (Gimble et al. 2003) i altres animals com rates (Huang et al. 2002) o conills (Dudas et al. 2006). La comparació entre les CMMA provinents de moll d'os amb les de greix, a l'espècie humana, revela una expressió similar de marcadors fenotípics (De Ugarte et al. 2003). Per tant, es podria assumir que tant a l'espècie humana com a l'ovina, les CMMA provinents de moll d'os i greix, són immunofenotípicament semblants.

La disposició de reserves més abundants, la baixa comorbiditat en l'extracció i el tipus de cirurgia, fan que les CMMA adiposes siguin considerades com una alternativa important a substituir les CMMA de moll d'os en les teràpies de medicina regenerativa, per tant, seran també estudiades en aquest treball.

Fins al moment, la majoria dels tractaments de CMMA provinents de teixit adipós s'han basat en una teràpia cel·lular on no s'utilitzen biomatrius. A la taula 1.6 es resumeixen els assaigs clínics que s'estan portant a terme amb CMMA provinents de teixit adipós. Es considera un teixit de fàcil accés i amb baixa comorbiditat, fins i tot alguns autors asseguruen que els rendiments d'extracció de CMMA són superiors als del moll d'os, entre 100-500 cops més (Casteilla et al. 2010).

Taula 1.6. Assaigs clínica que utilitzen com a font cel·lular CMMA d'origen adipós. rhBMP-2: recombinant human bone morphogenic protein 2; β TCP: beta-tricalcium phosphate; *Referència d'identificació d'assaig clínic a la web <http://clinicaltrials.gov>.

Malaltia	Disseny	Estatus	Referència
Reconstrucció maxil·lar	rhBMP-2 + β TCP + $13E+06$ CMMA autòlogues	1 cas clínic reportat	(Mesimäki et al. 2009)
Fístula associada a malaltia de Crohn	$20-40E+06$ CMMA autòlogues	Fase clínica II	NCT01011244*
Fístula perianal no associada a malaltia de Crohn	$20-40E+06$ CMMA autòlogues + fibrina	Fase clínica II completada- Fase III	NCT00475410*
Malaltia de l'empelt contra l'hoste	$1-3E+06$ CMMA autòlogues/kg	Fase clínica I	NCT01222039*
Diabetes (Isquèmia crònica de les extremitats)	CMMA autòlogues	Fase clínica I	NCT01079403*
Esclerosi múltiple secundària progressiva	$1-4E+06$ CMMA autòlogues/kg	Fase clínica I	NCT01056471*
Defectes ossis	CMMA+Empelt ossi	Fase clínica I	NCT01218945*
Artritis degenerativa	$1-10E+07$ CMMA autòlogues	Fase clínica I-II	NCT01300598*

Com es pot observar a la taula 1.6, només dos dels assaigs clínics amb CMMA provinents de teixit adipós estan indicats per a problemes osteoarticulars, però ni tan sols en aquest cas s'utilitza una estratègia similar a la proposada en aquest estudi, amb una biomatriu colonitzada de diferents densitats de CMMA provinents de teixit adipós. La majoria es basa en teràpies cel·lulars per al tractament de fístules, la malaltia de l'empelt contra l'hoste, isquèmia crònica de les extremitats i d'altres, amb dosis de CMMA entre $1E+06$ i $4E+07$ per pacient. Les administracions varien entre intramuscular, intravenós i intrateixit, però només aquelles que intenten regenerar os aborden el problema amb l'ajuda d'un biomaterial, ja sigui un empelt ossi o una biomatriu de fosfat tricàlcic- β .

1.1.3. Biomatrius compatibles per a la regeneració de teixits.

Existeix un ampli ventall de possibilitats per escollir d'entre les biomatrius comercials disponibles. S'han desenvolupat una sèrie de matrius per a medicina regenerativa, entre les que es poden seleccionar les més adients per a cada aplicació. L'aproximació tradicional de la medicina regenerativa ha estat colonitzar matrius amb cèl·lules per a proveir el neocartílag d'una estructura d'ancoratge i creixement (Jubel et al. 2008). L'arquitectura de la matriu pot afectar les propietats mecàniques del constructe, la distribució de la colonització, característiques difusionals i d'altres. A més a més, el material, per ell sol, pot contribuir a l'adhesió cel·lular, la proliferació, la diferenciació i la implantació. La biomatriu ha de complir amb tres requisits essencials (Athanasiou et al. 2009):

1. Tenir una estructura interna que permeti la difusió de nutrients i subproductes del metabolisme cel·lular.
2. Ser biocompatible i bioreabsorbible, amb una cinètica de degradació que sigui semblant a la formació del teixit.
3. Permetre l'ancoratge de cèl·lules, la seva proliferació i diferenciació.

Altres factors per escollir la matriu són el seu ús, si ha de ser immediat *in vivo*, o serà cultivat *in vitro* durant un temps abans de ser implantat. Si s'implanta directament, la matriu ha de disposar de les característiques mecàniques que s'adeqüin al teixit a regenerar per a suportar les càrregues del nou nínxol. Aquesta ha de mantenir la forma i l'estructura per protegir les cèl·lules de les forces a les que es veuran sotmeses al teixit. Alguns biomaterials són activats en el lloc del defecte un cop implantat per adquirir les propietats mecàniques adequades, però aquest procés químic addicional pot comportar l'alliberament de substàncies citotòxiques. Per això s'està investigant en polímers més robustos per evitar aquest pas addicional extra. Les matrius que es cultiven durant un temps *in vitro* no necessiten el mateix nivell d'integritat estructural ja que durant el cultiu es pot haver format un pseudo-neoteixit que proporcionarà les característiques mecàniques suficients per a integrar-se al teixit defectuós amb èxit. Aquesta aproximació seria independent de les característiques de degradació de la matriu, ja que només s'utilitza aquesta com a suport per a les cèl·lules durant un temps per a formar un teixit nou *in vitro*. Idealment, un cop el constructe ha estat implantat, ha de ser capaç d'adaptar-se satisfactòriament al nou

ambient. Existeix una gamma àmplia de biomaterials, de fet, uns els més utilitzats en el camp de la medicina regenerativa són el polímers sintètics.

Les matrius d'origen sintètic poden ser fabricades directament al laboratori o adquirides comercialment i, a diferència dels polímers naturals poden ser dissenyades en termes de característiques químiques i físiques específiques. Alguns dels aspectes claus per millorar les característiques del constructe, com la cinètica de degradació o les propietats mecàniques, poden ser alterades mitjançant modificacions en la composició química. Aquesta flexibilitat aporta més possibilitats per a dissenyar matrius o polímers amb cinètiques de degradació, activitat biològica o característiques mecàniques específiques.

En el cas de la regeneració de cartílag articular s'han utilitzat una gran varietat de biomatrius. Aquestes es solen dividir entre polímers naturals o sintètics, però existeixen altres tipus de classificacions com poden ser degradables i no degradables, la geometria de la matriu (gels, esponges poroses, fibres poroses) i l'estructura (porositat total, mida del porus, connectivitat i distribució) (Vunjak Novakovic 2003). A continuació s'exemplifiquen dos grups de biomaterials sintètics ja provats i caracteritzats per a la seva utilització en el camp de la medicina regenerativa de cartílag:

1. Poli-Etilen glicol (PEG) i Poli-Caprolactona (PCL): Aquests són uns polímers desenvolupats recentment. El PCL (figura 1.5) presenta un pes molecular elevat i un gran hidrofobicitat, per tant el seu temps de degradació és superiors a altres tipus de polímers, i és normalment més resistent, fent-lo més atractiu per aplicacions ortopèdiques. La resistència del PCL a una hidròlisis primària s'ha observat en experiments de regeneració de cartílag en ratolins, amb una degradació mínima (Honda et al. 2004).

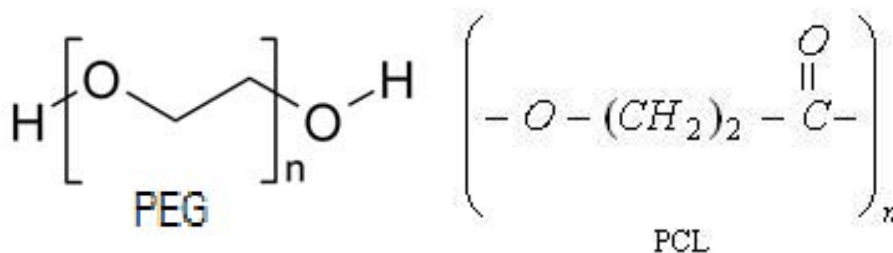


Fig. 1.5 Estructura química del Poli-Etilen glicol (PEG) i Poli-Caprolactona (PCL).

El PEG (figura 1.5.) presenta una propietat innovadora, donat que es pot controlar l'ancoratge de cèl·lules i proteïnes a la matriu mitjançant la modificació de la hidrofilitat/hidrofobicitat del material. El PEG dificulta l'adsorció de proteïnes i cèl·lules per la seva gran hidrofilitat, protegint de l'adsorció, per exemple, anticossos, prevenint així una resposta immune adversa (Suggs et al. 1999). El PEG pot ser incorporat a altres materials en copolímers i modificar les característiques d'ancoratge del polímer resultant, millorant la seva biocompatibilitat (Zimmermann et al. 2002). El PEG no està pensat per a ser utilitzat en solitari per a la regeneració de cartílag, ja que necessita ser copolimeritzat per a degradar-se en el cos. Representa més un valor afegit a altres polímers que un material que serveixi per si mateix per regenerar cartílag.

2. Poliglicols, polilàctids i copolímers dels anteriors: Aquests polímers tenen una llarga tradició en quant a la seva utilització en aplicacions mèdiques (Athanasίου et al. 1995; Athanasίου et al. 1998). Poden ser fabricats com a porosos, enxarxats, malles i nombroses possibilitats en quan a la forma i l'arquitectura. El més utilitzat en enginyeria tissular de cartílag fins al moment ha estat l'Àcid poli-glicòlic (PGA). El PGA és un polièster alfa (figura 1.6) que es degrada per hidròlisi. La degradació total es pot donar entre 4-12 mesos, bastant més ràpid que altres polièsters. La pèrdua de les propietats mecàniques és anterior a la degradació, algunes vegades fins i tot les primeres setmanes. Els productes de degradació del PGA són reabsorbits pel cos humà, fent biocompatible aquest material (Daniels et al. 1990).

La porositat i la interconnectivitat són elements claus en l'estructura d'aquest material i poden ser controlades mitjançant el procés de producció, ajustant les quantitats de reactius, en aquest cas la sal, per a formar els porus (Freed et al. 1994). Les formes més utilitzades en aplicacions de regeneració de cartílag són les malles no trenades (Athanasίου et al. 2009). La porositat de la malla és alta, permetent una bona difusió dels nutrients a través del constructe, i la interconnectivitat augmenta l'eficiència de la colonització cel·lular. Alguns experiments evidencien una producció de matriu extracel·lular idònia per a la regeneració de cartílag i corbes de degradació que el fa un candidat excel·lent. El fet de tenir un perfil de degradació conegut i previsible és un aspecte positiu, però també s'han investigat altres polímers per a tenir una integritat que perduri uns mesos més. Un exemple és l'Àcid poli-làctic (PLA), que al igual que el PGA ha estat aprovat per la FDA per a utilització en humans. El PLA generalment es degrada a velocitat inferior al PGA (entre 12 mesos i 2 anys) (Middleton et al. 2000). El PGA també compleix els requisits de biocompatibilitat i bioreabsorbibilitat, però alguns estudis indiquen que l'afinitat de les

cèl·lules per la superfície del PLA és inferior al PGA (Ishaug-Riley et al. 1999). El seu temps de degradació més perllongat permet la formació de matriu extracel·lular, fet important per aquelles aplicacions on es busqui aquest comportament (Grande et al. 1997).

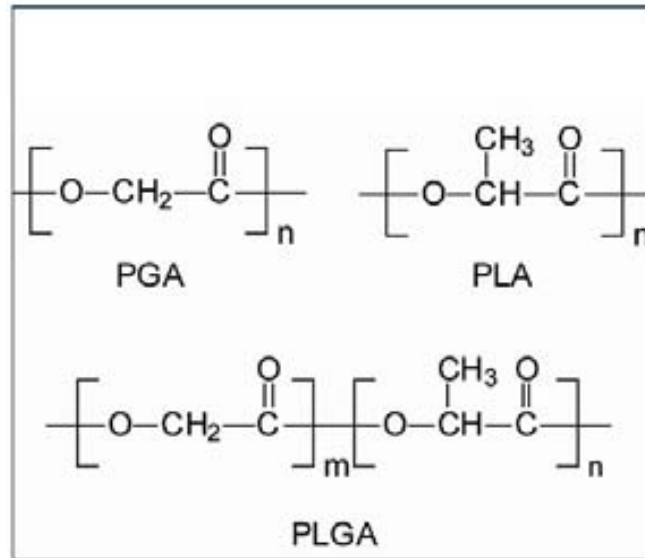


Figura 1.6. A l'esquerra, estructura química de l'Àcid Poliglicòlic (PGA), Àcid Polilàctic (PLA) i Àcid poli-làctic-co-glicòlic (PLGA).

L'Àcid poli-làctic-co-glicòlic (PLGA) consisteix en una copolimerització de dos monòmers, els dímers cíclics de l'àcid glicòlic i làctic (figura 1.6). Durant la polimerització, les unitats monomèriques s'uneixen amb enllaços èster donant un polièster alifàtic com a producte final. Les propietats del PLGA depenen de la proporció de cada monòmer. El PLGA és un copolímer biodegradable i biocompatible (Anderson et al. 1997; Panyam et al. 2003). Depenent de la relació entre l'àcid làctic i l'àcid glicòlic es poden obtenir varies formes de polímer de PLGA, amb les característiques físiques (propietats mecàniques, de transport de nutrients, interaccions polímer-cèl·lules i degradació) determinades per aquesta proporció, essent alguns dels més utilitzats el PLGA 75:25 (75% d'àcid làctic i 25% d'àcid glicòlic) (Sato et al. 2001), 50:50 (Park et al. 2005) o 90:10 (Chen et al. 2003). Depenent de la relació làctic:glicòlic utilitzada durant la polimerització, s'anomenen els PLGA amb la ràtio corresponent (per exemple PLGA 50:50, la composició és 50% Làctic i 50% Glicòlic). Per exemple, una formulació amb una gran part de PLA es degrada més lentament que no pas una amb la proporció de PGA més elevada. Un polímer de PLGA 75:25 mostra un temps de degradació entre 4 i 5 mesos, en canvi en una formulació de 50:50 es redueix el temps a 1 ó 2 mesos (Middleton et al. 2000). Aquesta degradació dona com a productes

molècules que són reabsorbibles o es degraden naturalment en el cos humà, per això aquesta matriu és biodegradable i biocompatible, tant a nivell d'aplicacions en animals com en aplicacions en clínica humana (Eid et al. 2001). El fet d'estar format bàsicament per làctic i glicòlic fa que, sota condicions fisiològiques normals, aquests són incorporats a vies metabòliques actives del cos humà, resultant reabsorbible i biocompatible (Athanasίου et al. 1997).

Entre d'altres aspectes importants a l'hora d'escollir el polímer adequat, s'ha de tenir en compte la procedència del material per a la fabricació del polímer. La fabricació i el processat ha de ser simple i ha de permetre l'adquisició d'una forma i una estructura característica, compatible amb les necessitats del teixit a regenerar. A més, aquest material ha de poder ser esterilitzat ja que en les expansions cel·lulars l'esterilitat és un punt clau.

Una altra de les característiques importants que s'ha de valorar en la selecció del polímer és la robustesa. Aquesta ha de ser similar al cartílag articular per permetre la seva manipulació al llarg de la teràpia, fet que determinarà si el polímer serà capaç de mimetitzar el teixit a regenerar, suportant els esforços de compressió, de torsió o d'estirament en els que es veurà immers un cop es trobi en l'entorn de la lesió a regenerar. Un dels paràmetres que millor defineix la robustesa del material és el mòdul d'elasticitat. Aquesta constant està relacionada de manera directa amb els canvis de longitud que experimenta el material quan és sotmès a una força de tracció i compressió. Està associat amb el canvi de la forma que experimenta sota l'acció d'esforços constants que impliquin canvis de forma, però no de volum.

En un treball anterior (Sarró 2010) es va comparar el mòdul d'elasticitat de cartílag humà amb diferents polímers comercials aplicant cicles d'esforços de compressió i relaxació, mitjançant un estimulador mecànic desenvolupat pel grup d'Instrumentació Electrònica i Biomèdica del Departament d'Enginyeria Electrònica de la UPC. A la taula 1.7. es mostren els diferents mòduls elàstics per a cadascun dels polímers mesurats. Els polímers que es van comparar van ser tot una sèrie de polímers naturals com el gel d'alginat, l'agarosa, la fibrina, i un de sintètic que ja s'ha esmentat anteriorment, el PLGA. En aquest cas es va utilitzar una proporció de PLGA 50:50.

Tal i com es pot observar a la taula 1.7., tant el gel d'alginat com el gel d'agarosa tenen un mòdul d'elasticitat molt petit. Per altra banda, tant el polímer de PLGA com el de fibrina, tenen un mòdul d'elasticitat superior i, a més, tenen un comportament totalment elàstic al llarg dels cicles de compressió i relaxació, amb un comportament totalment lineal tant en les etapes de compressió

com en les de relaxació dels polímers. Aquesta propietat, indica que ambdós són, en general, uns candidats ideals per a la regeneració tissular condrocitària.

Taula 1.7. Mòduls d'elasticitat pels diferents polímers obtinguts a partir de mesures de força i desplaçament durant cicles d'esforços de compressió i relaxació aplicats als polímers mitjançant un estimulador mecànic (Sarro 2010).

Polímer	Mòdul d'elasticitat (N/mm ²)
Gel d'alginat	3.56E-03
PLGA 50:50	6.54E-02
Fibrina	6.65E-01
Gel d'agarosa	6.92E-03
Cartílag	6.32E-02

El polímer ha de rebre una quantitat d'esforços de compressió i cisalla important, a la vegada que ha de mantenir una estructura robusta, tal i com fan les pròpies fibres de col·lagen del cartílag hialí. Aquest fet es pot corroborar comparant els valors d'elasticitat obtinguts pels dos polímers (taula 1.7.), amb el mòdul d'elasticitat del cartílag hialí, amb un valor de 4.27E-02 N/mm² obtingut a partir de la mesura mitjançant el mateix estimulador mecànic, d'una secció de cartílag hialí humà. El valor del mòdul d'elasticitat del cartílag hialí és més similar al polímer de PLGA (1.5 vegades superior al cartílag) que al polímer de fibrina (15.6 vegades superior al cartílag). Això fa que el polímer de PLGA sigui l'escollit per a la regeneració de cartílag front el polímer de fibrina ja que per a la correcta diferenciació del teixit l'ambient, on han d'anidar les cèl·lules, ha de mimetitzar el cartílag articular.

Cal fer esment també que el PLGA és un dels més comunament utilitzats en la medicina regenerativa (Herrmann et al. 1970) i a més està aprovat per la FDA per a productes terapèutics (Holland et al. 1986; Jain 2000). Alguns dels exemples que es poden trobar a la bibliografia sobre la utilització d'aquest biopolímer en el camp de la medicina regenerativa en diferents models animals són, l'ovella (Mainil-Varlet et al. 2001), el porc (Jiang et al. 2007), el conill (Uematsu et al. 2005) o el ratolí (Lee et al. 1994) entre d'altres. En el camp de la medicina regenerativa no només

s'utilitza per a la regeneració de cartílag, sinó també per a la regeneració de nervis (Wen et al. 2006) o teixit ossi (Thomson et al. 1996).

S'ha demostrat que la porositat és necessària per a permetre que les biomatrius colonitzades a altes densitats de sembra puguin rebre tots els nutrients necessaris durant el cultiu *in vitro* (Freed et al. 1998). Els porus han d'estar interconnectats per facilitar la transferència de nutrients i la eliminació de subproductes de les cèl·lules a través de tota la biomatriu (Lu et al. 2001; Woodfield et al. 2002). Un dels principals objectius en el disseny de les biomatrius és satisfer els requisits de transferència de matèria per a que la matriu extracel·lular (ME) es vagi acumulant i es formi l'estructura funcional que s'intenta regenerar en cada cas (Freed et al. 1998; Vunjak-Novakovic et al. 1998).

Molts dels estudis *in vitro* es basen en matriu cilíndriques amb unes dimensions entre 3-10 mm de diàmetre i 5mm-10mm d'espessor, amb un volum dintre del rang 0.007-0.39 cm³ (Vunjak-Novakovic et al. 1998). Per tal de que les cèl·lules puguin infiltrar el polímer uniformement, la biomatriu ha de contenir un gran nombre de porus interconnectats. La mida del porus òptima que es recomana, per a la regeneració de cartílag articular, es troba entre 100 i 200µm (Agrawal et al. 2001; Freyman et al. 2001).

En un futur, si es vol aplicar la teràpia en el àmbit clínic humà, es requereix que els materials i el procés de fabricació compleixin les normes de correcta fabricació o GMP (*Good Manufacture Practices*). Pot resultar complicat dissenyar i validar un procés de fabricació de la biomatriu, ja que requereix unes instal·lacions molt costoses com són les sales blanques (Gee 2009). Així doncs resulta lògic, ja des d'un inici, dissenyar l'experiment amb un tipus de material que estigui disponible en el mercat amb qualitat GMP.

En el cas de les matrius de PLGA, existeixen en el mercat diferents tipus de matriu, ja siguin malles trenades o no, amb diferents geometries. L'empresa *Concordia Medical* produeix aquest material en qualitat GMP i pot generar diferents matrius amb diferents geometries, i propietats. Hi ha exemples de la utilització d'aquest material BIOFELT® en recerca bàsica, per exemple, per a la regeneració de teixit ossi (Kretlow et al. 2010). A la figura 1.7. es mostren algunes de les formulacions d'aquestes matrius.

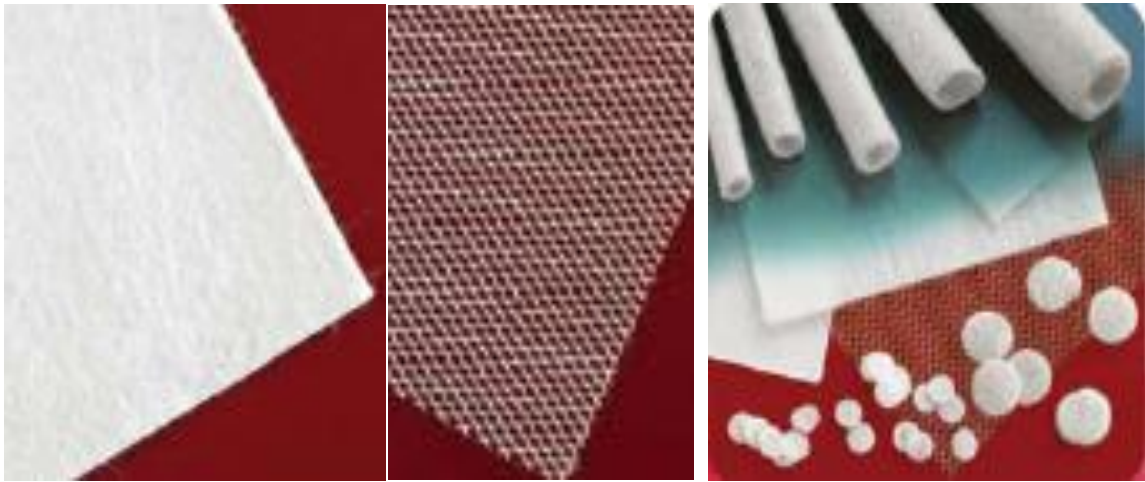


Figura 1.7. PLGA (*Concordia biomedical*) amb qualitat GMP. A l'esquerra tenim una malla no trenada de PLGA, al mig un malla trenada de PLGA i a la dreta malla no trenada de PLGA manufacturada amb diferents geometries (rectangular, circulars).

Per les seves característiques biomecàniques, estructurals i la disponibilitat comercial d'una versió amb qualitat GMP, durant aquest treball, al capítol 3 es realitza una posta a punt de la fabricació del PLGA i la seva colonització per a la regeneració de cartílag articular.

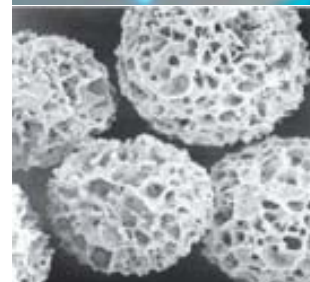
1.2. Tecnologia de cultiu.

Les CMMA són unes cèl·lules dependents d'una superfície a la que adherir-se per poder créixer (cèl·lules dependents d'ancoratge). Les expectatives clíniques que presenten les CMMA generen una demanda de grans quantitats de cèl·lules per a la regeneració de teixits. Els sistemes més habitualment emprats al laboratori presenten limitacions per tal d'assolir les quantitats necessàries de cèl·lules, donat que no disposen de prou superfície. Cal doncs emprar sistemes que permetin superar aquestes limitacions i assolir escales de cultiu més elevades.

Actualment existeixen diferents mètodes de cultiu disponibles comercialment al mercat per cultius a gran escala de CMMA, que es resumeixen a la taula 1.9. Les CMMA han demostrat créixer satisfactòriament en aquests sistemes de cultiu mantenint els seu fenotip i la capacitat de generar una matriu extracel·lular cartilaginosa (Freed et al. 1994).

Taula 1.9 Avantatges i inconvenients dels diferents sistemes de cultiu existents (Melero-Martin et al. 2007).

Cultiu de cèl·lules adherents		
Sistema de cultiu	Avantatges	Inconvenients
T-Flask	· Simple · Ben caracteritzat	· Escalat difícil · Molt laboriós · Sense control de paràmetres · No perfusió
Cell Factories	· Escala elevada (respecte al T-Flask)	· Laboriós · Sense control de paràmetres · No perfusió
Roller Bottle	· Ràtio Àrea superficial/Volum elevat	· Laboriós · Sense control de paràmetres · No perfusió
Cell Cube	· Ràtio Àrea superficial/Volum elevat · Perfusió	· Car · Sense control de paràmetres · No perfusió
Pellet cultures	· Simple · Perfusió · Control de paràmetres	· Desanclatge cel·lular · Velocitats de creixements lentes
Hydrogel cultures	· Perfusió · Control de paràmetres	· Possible limitació per transferència de matèria · Velocitats de creixements lentes
Microcarriers cultures	· Ràtio Àrea superficial/Volum molt elevat · Control de paràmetres · Perfusió	· Cèl·lules exposades a forces tensionals/estrés · Alguns tipus cel·lulars mostren creixement més lent comparat amb monocapa



1.2.1. Medis de cultiu i additius.

En el cultiu de cèl·lules animals, en aquest cas concret de CMMA, a nivell de recerca està àmpliament estesa la utilització del medi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com a base per al creixement cel·lular. Aquest és un medi, descrit amb detall al capítol 7, que conté els nutrients i components necessaris per al manteniment de les cèl·lules. Existeixen altres medis comercials disponibles, alguns per a ús de recerca i d'altres definits per a ús clínic. Durant aquest treball no s'han utilitzat medis definits amb qualitat GMP per el seu elevat cost i la dificultat en la seva definició. La importància dels medis, i sobretot dels additius com els sèrums que s'utilitzen per suplementar els medis, recau en la seva influència sobre l'aïllament, el creixement i la morfologia de les CMMA.

El sèrum és el medi on es troben els eritròcits i leucòcits *in vivo*, i per tant, no és sorprenent que sigui un suplement excel·lent en els cultius *in vitro* (Maurer 1986). Des dels principis dels cultius cel·lulars els investigadors han afegit sèrum al medi bàsic de cultiu en una concentració del 1 al 20% (v/v) per fer créixer gairebé tots els tipus cel·lulars (Shacter 1989). Les principals funcions del sèrum són proveir als cultius d'una sèrie de compostos amb diferents activitats que afavoreixen el creixement cel·lular a partir dels seus precursors (Barnes et al. 1980). Entre aquests compostos del sèrum es destaquen :

- Factors hormonals estimuladors del creixement i de diverses funcions cel·lulars: La majoria d'ells es troben en concentracions de l'ordre de nanograms per mL en el sèrum. Alguns d'ells són específics per a cèl·lules en diferents estadis de diferenciació i d'altres no estan restringits a un sol tipus cel·lular.
- Factors d'adhesió i extensió: Moltes cèl·lules animals s'han d'adherir primer a un determinat substrat i estendre's abans que puguin començar a proliferar i formar una monocapa. Aquest adheriment a un substrat és necessari pel creixement d'algunes, però no de totes les cèl·lules cultivades *in vitro*.
- Proteïnes de transport: L'albumina és l'exemple més clar d'aquest tipus de proteïnes; donada la seva càrrega negativa s'uneix a àcids grassos lliures, vitamines, lípids i hormones entre d'altres, i transporta aquestes molècules entre els teixits i les cèl·lules tant *in vivo* com *in vitro*.
- Elements traça: El paper de varis elements traça inorgànics ha estat només parcialment estudiat, però molts actuen com a cofactors d'enzims.
- El sèrum té una capacitat tamponadora important, bàsicament deguda a la presència d'albumina.

- Inhibidors específics de proteases: Aquests protegeixen a les cèl·lules de les proteases afegides al medi per subcultivar cèl·lules adherents, així com de les proteases alliberades per la pròpia cèl·lula.
- Agents estabilitzadors i detoxificadors del cultiu: Alguns components del sèrum poden unir-se i detoxificar metalls pesats o compostos orgànics que es puguin trobar en el medi.

A més dels components que s'han descrit a l'apartat anterior, el sèrum conté també una àmplia varietat de components, components que o bé estan poc caracteritzats, o encara no s'han identificat i variació entre lots. Tot i aquest gran nombre de components presents al sèrum, sembla que només molt pocs són realment essencials (Glassy et al. 1988).

No hi ha protocols d'aïllament de CMMA que no requereixin d'addició de sèrum al medi base. La concentració del sèrum varia en un rang entre el 2% i el 20% (v/v). La majoria dels estudis utilitzen *fetal calf serum* (FCS), però la legislació i les complicacions de reaccions immunes han fet que s'investigui en alternatives com el sèrum d'origen humà autòleg, heteròleg, plasma ric en plaquetes i d'altres alternatives (pools de sèrum). L'impacte del sèrum en la composició d'aquests medis és desconegut, ja que no és un medi definit, però hi ha indicis com les velocitats de creixement i la morfologia (figura 1.8) que indiquen la seva rellevància. Aquests fets fan necessari un desenvolupament de medis definits lliures de sèrum o nous sèrums que permetin estandarditzar la producció cel·lular de CMMA per a passar a fases clíniques, complint amb la legislació vigent. Durant el capítol 3 es desenvolupa la preparació de sèrum per a l'espècie ovina, amb una sèrie d'experiments amb sèrum autòleg obtingut d'exèresis sanguínies.

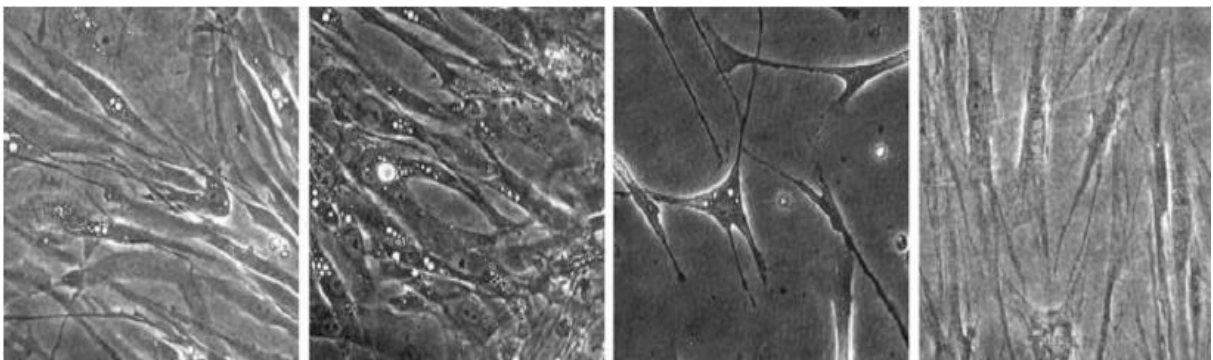


Figura 1.8. Impacte de l'addició de suplementes a la morfologia cel·lular. D'esquerra a dreta, medi convencional amb 2% de FCS, medi convencional amb albumina 50mg/ml, medi convencional sense FCS o albúmina, DMEM amb 2% FCS (Wagner et al. 2007).

1.3. Perspectives d'aplicació.

Els avenços en el coneixement de la biologia de les cèl·lules mare ha mostrat un futur prometedor per fer front a reptes com el que proposa la medicina regenerativa. Mentre alguns pensen que s'ha sobreestimat el potencial mèdic de les aplicacions de les cèl·lules mare, una anàlisi dels beneficis potencials per a diferents patologies, només als EUA, estima que unes 128 milions de persones es podrien beneficiar. Entre d'altres destaquen pacients amb malalties cardiovasculars, autoimmunes, diabetis, patologia musculoesquelètica, etc (figura 1.9) (Perry 2000).

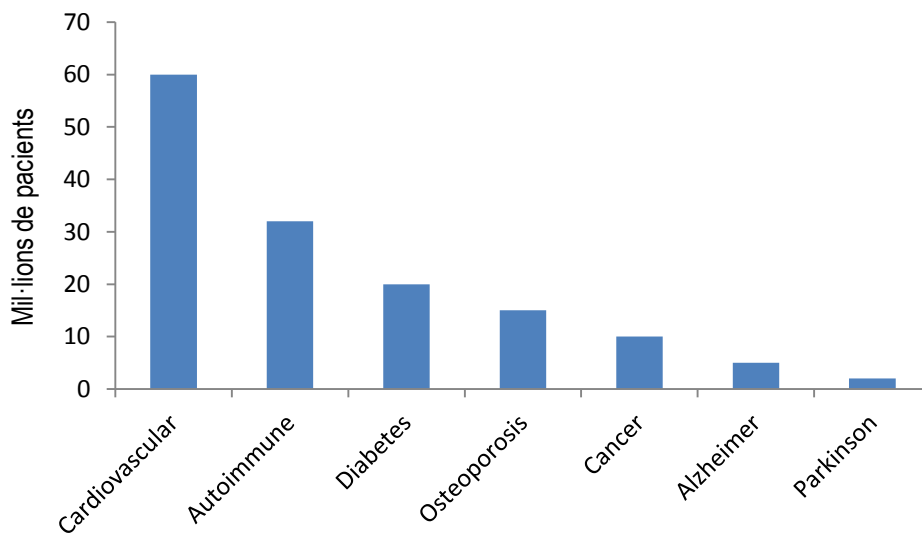


Figura 1.9 Estimació de pacients amb diverses patologies que es poden beneficiar de tractaments derivats de la recerca en cèl·lules mare (Perry 2000).

Altres aplicacions són atribuïdes a les cèl·lules mare, no tan sols com a maquinaria cel·lular, sinó com a sistema de "*gene delivery*", testat de productes farmacològics, estudis genètics de mutacions letals en humans i substituïts de models animals.

En el cas de les patologies articulars que impliquen un defecte en el cartílag articular, un estudi retrospectiu a Alemanya, on es van estudiar 1708 pacients, va quantificar que els costos indirectes de pèrdua de productivitat eren 4 vegades superiors als costos directes derivats de les operacions i els tractaments (Upmeier et al. 2007). Altres causes de lesions traumàtiques són les ferides de guerra, on el departament de defensa dels EUA quantifica en 2 bilions de dòlars la factura per les admissions en hospitals de ferits de guerra a Afganistan i Iraq durant el període

2001-05 (Masini et al. 2009). Si no es tracten correctament, aquestes ferides traumàtiques poden derivar en altres malalties com l'OA, generant un increment encara major de costos associats.

L'osteoartritis causa dolor i sofriment als pacients i el cost social és elevat. Per exemple, als EUA, els costos directes i indirectes generats per l'OA es calculen en 65 bilions de dòlars per any (Jackson et al. 2001). Amb una aproximació conservativa, 1 de cada 8 americans majors de 25 anys han manifestat clínicament símptomes d'OA, convertint aquesta malaltia en la primera causa d'inhabilitació als EUA (Lawrence et al. 2008). La comorbiditat d'aquesta malaltia amb altres processos associats o derivats de complicacions de la malaltia agreugen aquest problema, incrementant els costos. S'estima que als EUA l'any 2005 hi havia 45 milions d'afectats, un 21% de la població adulta. Es parla d'un mercat milionari per als tractaments de l'OA, en 2005 es va estimar en uns 5 bilions de dòlars, amb un creixement anual del 5%. S'estima que la quota de mercat per a la regeneració de cartílag, os i altres teixits connectius és aproximadament d'uns 15,5 bilions de dòlars.

Un dels principals reptes de la teràpia cel·lular és desenvolupar sistemes d'expansió cel·lular capaços d'abastir la demanada que es generarà un cop establertes les teràpies cel·lulars. En el cas del cartílag articular, s'estima que hi ha una incidència al voltant de 30 milions de casos d'OA de genoll i 1,2 milions de casos de defectes condrials cada any als EUA, en majors de 50 anys (Medtech Insight 2002). És interessant estimar les necessitats de la producció cel·lular necessària per a portar a terme totes aquestes teràpies. Aquesta estimació es presenta a la taula 1.10.

Taula 1.10. Necessitats globals de producció de CMMA. S'assumeix que de l'incidència global de les indicacions, només un 10% podrien ser beneficiàries de l'aplicació de tractaments de medicina regenerativa. * S'estima una concentració de 64 milions de CMMA/cm³.** Grandària referenciada per Smith&Nephew Research Centre, York, UK.(Melero-Martin et al. 2007)

NECESSITATS GLOBALES DE CMMA

Indicació	Incidència global de procediments quirúrgics		
Defectes focals en cartílag articular	1,2·10 ⁶		
Osteoartritis de genoll	3·10 ⁷		
Tractament de medicina regenerativa		Nombre d'implants	Cèl·lules requerides*
Mida mitjana d'un defecte articular humà (4mmx40mm)**		1	3·10 ⁸
10% de la incidència de defectes focals		1,2·10 ⁵	3,9·10 ¹³
10% de la incidència de Osteoartritis de genoll		3·10 ⁶	1,9·10 ¹⁵

Com a resum, s'ha postulat una superfície de defecte condral a regenerar d'uns 4 mm de profunditat i 40 mm de diàmetre, mentre per osteoartritis seria necessària el doble. A la literatura existeix molt poca sistemàtica en quan a les densitats de sembra dels cultiu i dels constructes. Alguns estudis postulen que el rang cel·lular de colonització ideal per a la regeneració de cartílag mitjançant constructes osteocondrals ha de ser entre 20 i 100 milions de cèl·lules per centímetre cúbic (Puelacher et al. 1994). A l'estimació s'ha considerat una densitat de colonització de 64 milions de cèl·lules per centímetre cúbic, obtenint una quantitat total necessària de cèl·lules de 320 milions. Estimant que només un 10% dels defectes condrals observats a les artroscòpies son candidats per a teràpia cel·lular, la producció mundial que s'ha d'afrontar, només per a regenerar cartílag, varia entre $3.84E+13$ i $1.92E+15$ cèl·lules per a defectes focals i osteoàrtrítics respectivament.

En el mercat ja existeixen alguns productes basat en al medicina regenerativa i alguns d'ells es troben resumits a la taula 1.11. Es pot observar que les unitats manufacturades i els pacients tractats no coincideixen en nombre en tots els productes, ja que per exemple, en el cas de Epicel®, es pot fer *banking* de cèl·lules i emmagatzemar el material biològic fins que sigui necessari. En el cas de les aplicacions de cartílag, de les dades disponibles, són 17500 pacients els que s'han tractat des de 1995, quan es va aprovar la comercialització de Carticel ®. En total, dels productes de medicina regenerativa s'han manufacturat des de 1995 fins a 2010 unes 675.000 unitats i s'han tractat més de 334.000 pacients en diferents països (Mason et al. 2010).

Taula 1.11. Exemples de productes comercialitzats amb les unitats manufacturades i pacients tractats fins al 31-03-2010.(Mason et al. 2010)

Producte	Empresa	Unitats manufacturades fins al 31-03-2010	Pacients tractats fins al 31-03-2010
Carticel®	Genzyme (EUA)	17000	17000
Chondrocelect®	Tigenix(Bèlgica)	500	500
Epicel®	Genzyme (EUA)	127509	1653
Osteocel®	NuVasive(EUA)	35000	35000

Existeixen diverses estimacions que situen el cost d'una teràpia basada en medicina regenerativa al voltant dels 100-170 milions de dòlars i 7-8 anys per portar al mercat un producte des de el seu desenvolupament més bàsic, si no es troben problemes durant el procés, si fos així

el procés es podria encarir fins als 560 milions de dòlars (Hollister 2009). Durant aquest treball ja s'han explicat les diferents fases per les quals s'han de passar el desenvolupament d'un producte de medicina regenerativa, encara que en aquest cas no es pot realitzar un anàlisi econòmic de costos perquè es desconeixen multitud de variables que poden afectar al desenvolupament del producte. Per posar un exemple, s'estima que Carticel® va costar de desenvolupar uns 140 milions de dòlars. Actualment el cost d'una teràpia completa de TAC als EUA pot arribar a costar entre 17.000 i 35.000 dòlars per pacient en funció de les unitats de condrocits que necessiti el pacient. Amb el TAC es crea un banc de cèl·lules del propi pacient i cada unitat addicional que pugui requerir el pacient costa 10.000 dòlars. Les unitats addicionals són més econòmiques perquè no requereixen de la cirurgia per a l'obtenció de cartílag autòleg i l'aïllament dels condrocits.

El retorn d'inversió és molt baix i el temps de retorn és excessivament alt per a unes inversions que no acostumen a donar beneficis, ja que només el 30,2% de les teràpies són clínicament satisfactòries en el moment que reben l'aprovació regulatòria corresponent (Hollister 2009). La necessitat de reduir aquests costos operacionals i millorar les teràpies existents són alguns dels objectius que persegueix aquest treball.

1.4. Cartílag.

El cartílag és un teixit que pertany al teixit connectiu que forma part del sistema esquelètic. Principalment està format per fibres d'elastina, col·lagen i condrocits, les cèl·lules característiques del teixit cartilaginós que es troben incloses dins d'una matriu d'aspecte gelatinós. La composició diferencial de cadascun dels elements característics determina el tipus de cartílag: hialí (articular), elàstic i fibrocartílag. Les característiques més importants dels tipus de cartílag es descriuen a continuació (Hollister 2001):

- Cartílag hialí: És el més abundant dels tres, avascular i format principalment per fibres de col·lagen tipus II reforçant la matriu amorfa de substància fonamental. Es troba a les superfícies articulars dels ossos, en les plaques de creixement dels ossos llargs, cartílago costals, esquelet nasal i com a teixit de suport de les vies respiratòries (laringe, tràquea).

La matriu està formada per glucosaminoglucans (GAG) com l'àcid hialurònic (AH), el sulfat de condroitina i el queratan sulfat, que s'uneixen a una proteïna nuclear anomenada aggrecan, per formar els proteoglicans de gran mida molecular, donant una gran resistència a la deformació per compressió i facilitant la difusió de petites molècules i gasos dintre del cartílag i cap a l'interior. Presenta una organització cel·lular columnar a la major part del seu gruix (figura 1.10). L'alta hidrofilitat dels GAG's reté una quantitat d'aigua suficient com per suplir la falta de vascularització.

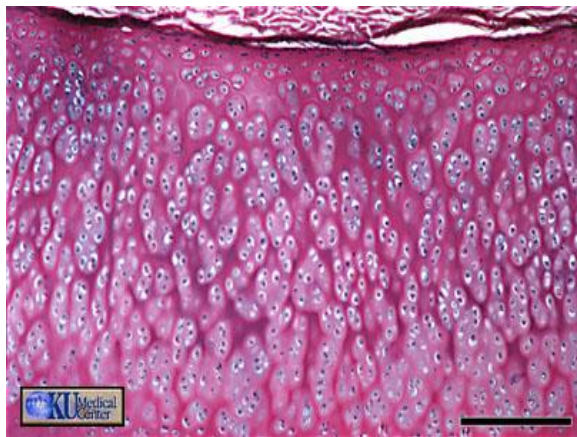


Figura 1.10 Cartílag hialí on s'observa l'organització columnar dels condrocits. Barra = 250 Micres

- Cartílag elàstic: Les fibres d'elastina són la característica diferencial, es troben en gran abundància en les llacunes de condrocits (figura 1.11), però també tenen com a component principal les fibres de col·lagen tipus II. A simple vista és groguenc i presenta major elasticitat i flexibilitat que el cartílag hialí. Es pot trobar a l'epiglòtis, en les parets del conducte auditiu extern, en la trompa d'Eustaqüi i en el cartílag corniculat i del cuneïforme de la laringe.

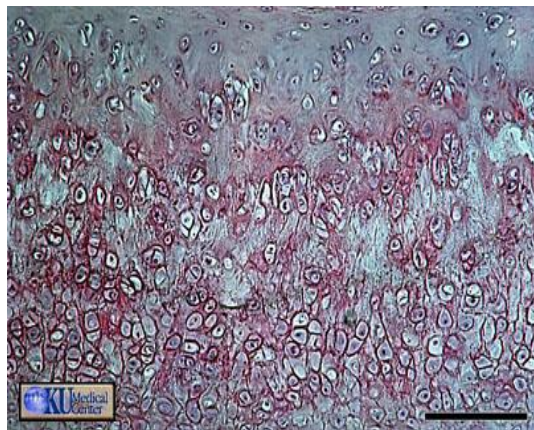


Figura 1.11 Cartílag elàstic amb l'elastina tenyida gris. Barra = 100 Micres

- Fibrocartílag: Es troba en discs intervertebrals, articulars, en els meniscs del genoll, en les unions tendó-os i en les unions dels ossos plans de la pelvis (símfisi púbica). Les característiques principals recorden a una forma de transició entre el teixit connectiu dens i el cartílag hialí, donat que està format per una combinació de fibres denses de col·lagen i de condrocits ubicats a les llacunes rodejades de quantitats variables de matriu hialina (figura 1.12). La matriu extracel·lular està formada per col·lagen tipus I i II, condrocits que es disposen en files (grups isogènics lineals) entre les que es troben feixos ondulants de fibres de col·lagen i l'absència de pericondri.

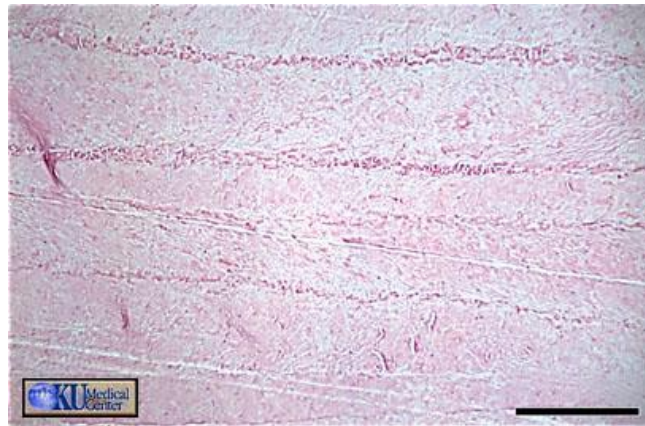


Figura 1.12. Fibrocartílag on s'observa la baixa densitat cel·lular i la disposició dels condrocits al llarg de les fibres de col·lagen tipus I. Barra = 250 Micres

1.4.1. Estructura del cartílag articular sa.

El cartílag articular presenta una durabilitat i unes propietats mecàniques extraordinàries, fins i tot quan sols mesura uns mil·límetres de gruix. La seva estructura i composició el fan únic per proveir a les articulacions una superfície que combina una excel·lent lubricació, mínima fricció, absorció d'impactes i una resistència mecànica a les contínues càrregues que sofreix una persona al llarg de la seva vida (Bach et al. 2007).

Al voltant de cada condrocit s'ha definit una zona pericel·lular, una zona d'influència d'aquella cèl·lula, anomenada condró, i que es considera la unitat primària del cartílag des del punt de vista estructural, funcional i metabòlic (Poole 1997). La microscopia òptica mostra diferents capes esquematitzades a la figura 1.13 que es diferencien per la densitat de la cel·lularitat i la forma dels condrocits, que indica diferents propietats mecàniques i bioquímiques que ens permeten dividir el cartílag articular en quatre zones (Milgram 1990):

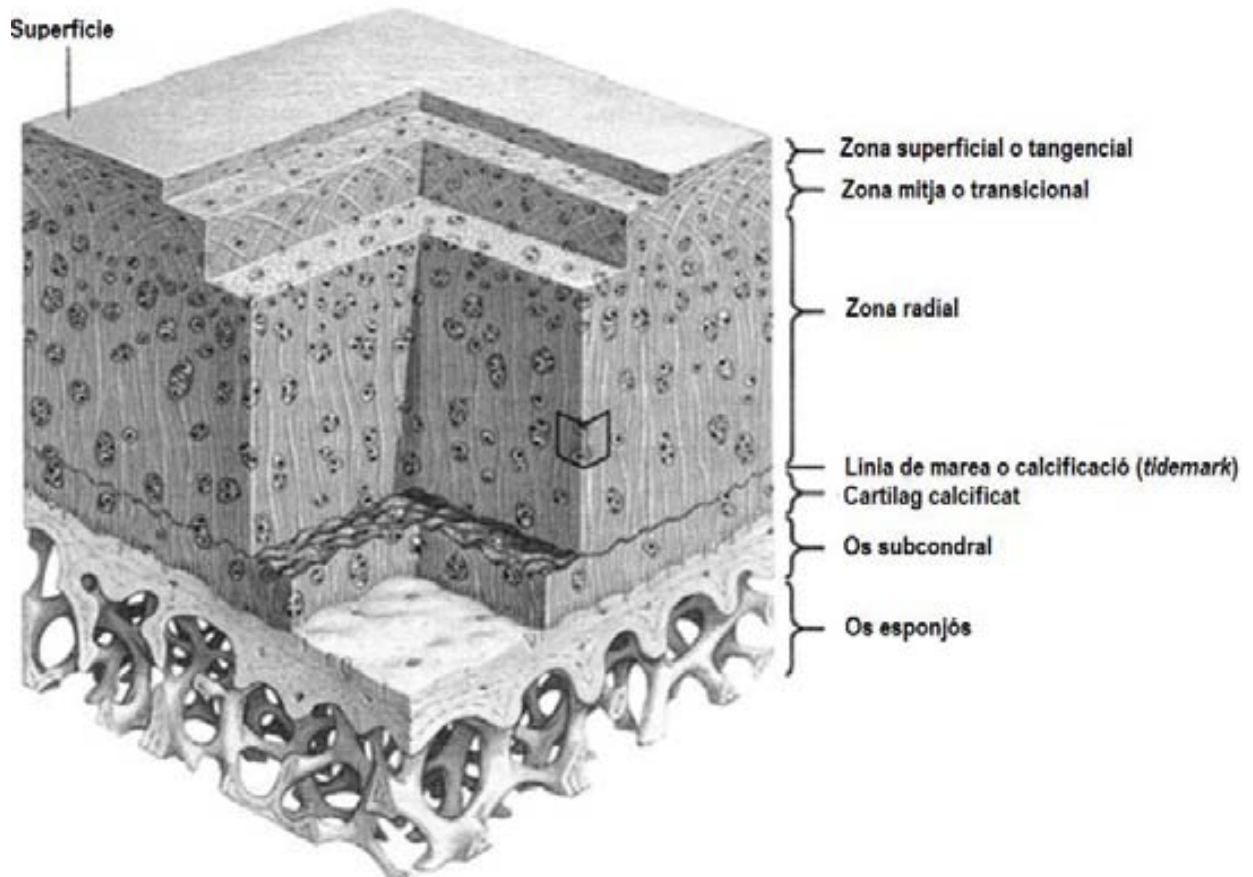


Figura 1.13. Estructura microscòpica del cartílag hialí. Adaptada de <http://www.netterimages.com/image/7498.htm>.

- Zona superficial o tangencial (zona I): conté condrocits de mida petita i aplanats que semblen fibròcits, que estan situats de forma paral·lela a la superfície articular. El contingut en proteoglicans (PG) es baix i les fibres de col·lagen es disposen preferentment paral·leles a la superfície (Eyre et al. 2002). A més s'ha observat que la part més superficial d'aquesta zona està desprovista de cèl·lules, i les fibres de col·lagen formen un coberta proteica compacta i semitransparent, anomenada *lamina splendens* (Clark et al. 1990). Aquesta coberta protegeix al cartílag de l'abradió i transmet les forces de compressió desde la superfície cap als margens del cartílag.

- Zona mitja o transicional (zona II): representa el 40-60% del grosor total i presenta condrocits més el·líptics i escampats per la matriu, que conté fibres de col·lagen d'entre 30-60 nm en una disposició obliqua d'una manera aparentment desorganitzada.

- Zona radial o profunda (zona III): conté columnes de condrocits rodons i columnes de fibres de col·lagen gruixut paral·leles (Mankin 1997). Aquestes fibres estan ancorades a la capa calcificada

sense arribar a l'os subcondral i són perpendiculars a les de la capa superficial (Bullough 1983). El contingut en PG és alt i el d'aigua és baix.

- Zona calcificada: conté columnes de col·lagen sense una orientació definida i condrocits rodons en nius, però no PG, en una matriu calcificada amb cristalls d'hidroxiapatita càlcica. La tinció amb hematoxilina i eosina mostra una línia ondulant anomenada *tidemark* o línia de marea que separa les capes radial i calcificada. Aquesta zona actua com a amortidor mecànic entre el cartílag articular no calcificat i l'os subcondral (Goldring et al. 2008)

1.4.1.1. Condròcits.

El cartílag és un teixit relativament pobre en cèl·lules. El condrocit (figura 1.14) és l'únic tipus cel·lular que es troba al cartílag articular. Aquestes cèl·lules deriven de cèl·lules mesenquimals i durant el creixement formen la matriu cartilaginosa. Amb la maduració, la densitat cel·lular del cartílag disminueix però es manté relativament constant al llarg de tota la vida (Stockwell 1967). El metabolisme cel·lular està molt disminuït al cartílag articular adult, però els condrocits encara són actius i responen a diferents estímuls com mediadors metabòlics (Fukuda et al. 1995), agents farmacològics, composició de la matriu, pressió mecànica i canvis en la pressió hidrostàtica. No responen a estímuls nerviosos (el cartílag és un teixit avascular) ni a estímuls immunològics, ja que presenten una membrana sinovial que actua de barrera hematoprotectora.

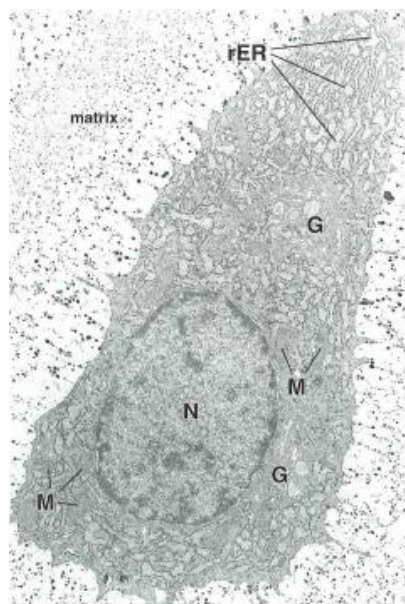


Figura 1.14. Condròcit fotografiat per microscopia electrònica (15000X). M: Mitocondria; N: Nucli; G: Aparell de Golgi; rER: Reticle endoplasmàtic; M: Matriu extracel·lular. (Ross et al. 2006)

Els condrocits apareixen en la fase de creixement de l'os a partir dels condroblastes, que deriven de les cèl·lules mesenquimals. En l'embrió, el mesènquima (o mesoderma) donarà lloc a les estructures de l'aparell locomotor. En l'esbós cartilaginós dels ossos, les cèl·lules mesenquimals es diferencien cap a condroblastes (Hamerman et al. 1970). Els condroblastes secreten la matriu cartilaginosa, donant al teixit l'aparença que les cèl·lules hagin migrat a la capa superficial, on reben forces de capes profundes, els condroblastes es divideixen creant columnes de cèl·lules que es van separant progressivament d'aquella capa a mesura que el teixit augmenta el seu gruix gràcies a la secreció de matriu per les pròpies cèl·lules (Archer et al. 1994). De fet, la secreció de matriu és el que va separant les cèl·lules fins que arriben a la maduresa i llavors es redueix dràsticament la seva activitat metabòlica, establint-se la quantitat de matriu al seu voltant.

1.4.1.2. Matriu extracel·lular cartilaginosa.

El cartílag hialí es conforma per les cèl·lules i la seva matriu. Les peculiaritats de la matriu són les que proporcionen les característiques mecàniques i les funcions al teixit. Aquestes funcions són principalment les de suport de la càrrega mecànica, absorció i distribució del xoc mecànic en les superfícies articulars diartroides, i les de proporcionar una lubricació i fricció idònies per a disminuir el desgast durant el moviment d'aquestes.

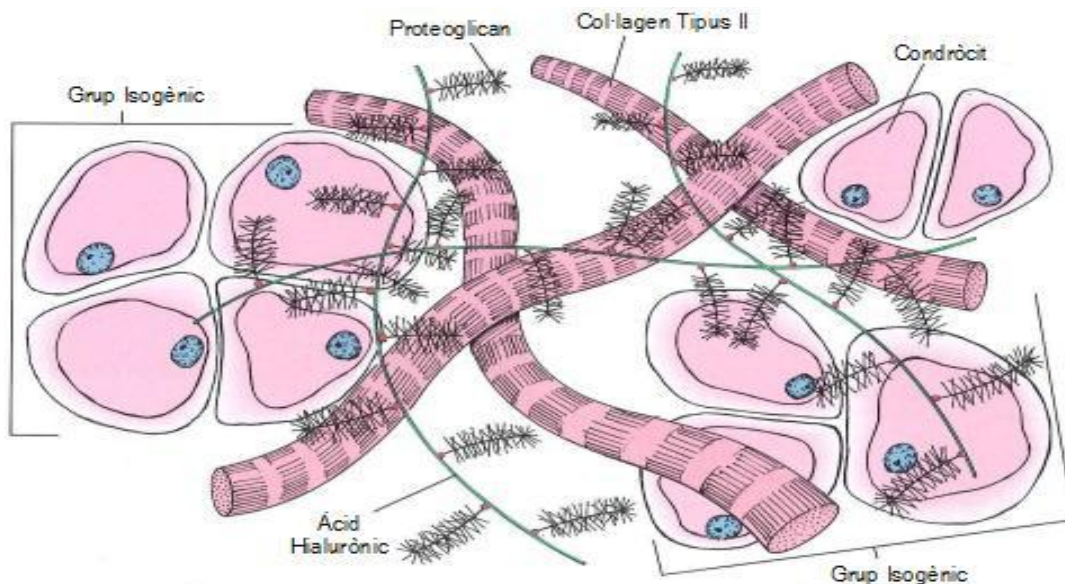


Figura 1.15. Esquema de l'estructura microscòpica de la matriu extracel·lular cartilaginosa. Els condrocits, organitzats en grups isogènics, es troben envoltats per una xarxa proteica on els components principals són col·lagen tipus II, proteoglicans i àcid hialurònic. Adaptat de (Ross et al. 2006).

La matriu que confereix aquestes propietats està formada per dos elements presents en el líquid sinovial, la xarxa de macromolècules proteiques i el líquid sinovial. El líquid sinovial està format en gran part per aigua (fins un 80%), gasos, proteïnes, nutrients i una alta concentració de cations per equilibrar la càrrega negativa dels proteoglicans (PG) de la xarxa proteica. Aquesta xarxa proteica es defineix per una composició variable de col·lagen, PG, proteïnes no col·lagenes i glicoproteïnes. El col·lagen es el component majoritari, amb un 60% del pes sec del cartílag hialí, disposat en xarxes que donen estabilitat i rigidesa per la seva interacció amb els PG.

El col·lagen característic del cartílag hialí és el de tipus II, com ja s'ha comentat anteriorment, representant fins a un 90% del col·lagen present. La seva funció és proporcionar al teixit propietats tensils i fixar els PG a la matriu extracel·lular. En canvi, amb una representativitat inferior, però amb una importància vital hi ha els PG, macromolècules secretades pels condrocits formades per glicosaminoglicans (GAG's). Alguns exemples de GAG's en són el sulfat de condroitina, el queratan sulfat, el dermatan sulfat i l'àcid hialurònic, aquest últim no sulfatat que serveix per la unió dels PG, que a la vegada estan formats per GAG's units a un nucli proteic (figura 1.15.). Els PG i les proteïnes no col·lagenes s'uneixen a la xarxa de col·lagen per interactuar mecànicament amb l'aigua, proporcionant aquesta rigidesa característica del cartílag hialí.

Els proteoglicans són un dels dos tipus de macromolècules, junt al col·lagens, que contribueixen a la funció de càrrega del cartílag articular, representant aproximadament el 10-15% del pes sec d'aquest. Són produïts pels condrocits i secretats a la matriu extracel·lular per la realització de la seva funció. L'estructura bàsica dels PG està formada per un complex macromolecular consistent en una proteïna que forma el nucli de l'estructura on s'uneixen covalentment diverses cadenes de glucosaminoglicans (GAG). Els GAG estan formats principalment per unitats de sulfat de condroitina i queratan sulfat. Els agrekans inclouen una proteïna d'alt pes molecular i representen el 80-90% dels proteoglicans.

El biglicà i la decorina són uns proteoglicans del cartílag amb una proteïna central més petita que l'agrecà. Les dues tenen forma de ferradura (Scott 1996). El biglicà conté dues cadenes de dermatan sulfat i la decorina només una. El biglicà es troba al voltant de les cèl·lules i podria estar implicat en l'organització de la matriu pericel·lular i la protecció mecànica de la cèl·lula (Little et al. 1996). El biglicà representa el PG de baix pes molecular més abundant al cartílag articular adult (McAlinden et al. 2001).

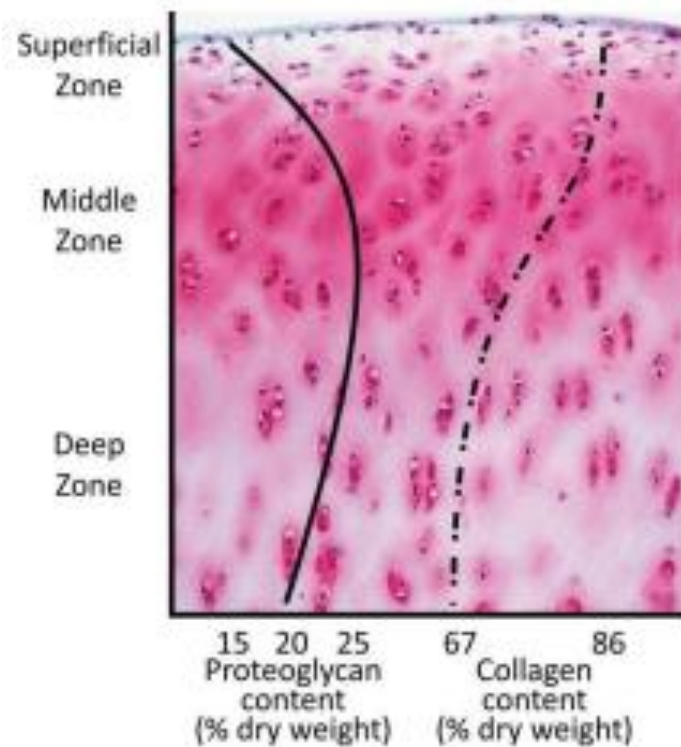


Figura 1.16. La concentració de proteoglicans i col·lagen varia en funció de la zona. Els proteoglicans varien entre el 15-25% respecte al pes sec i el col·lagen entre el 67-86%. (Athanasίου et al. 2009)

La distribució dels proteoglicans al cartílag no és homogènia (figura 1.16). Són escassos a la zona superficial i la seva concentració és més alta a la zona transicional. A la zona profunda la distribució no és tant homogènia com a la transicional. La seva concentració és més alta immediatament al voltant dels condrocits; però a totes les capes varia molt amb l'edat i la malaltia, a l'igual que el tipus de PG. Són grans molècules que actuen com una molla, deformant-se sota pressió i, quan cedeix, recuperant la seva forma original. Això contribueix a la propietat del cartílag anomenada elasticitat.

1.4.2. Maduració del cartílag.

En condicions normals, el cartílag se presenta una coloració blanquinosa i una brillantor característica (figura 1.17). A nivell macroscòpic la coloració del cartílag canvia amb l'edat, blavós al cartílag immadur, probablement reflex de les estructures vasculars a la seva base i pel seu gruix relatiu, i groc marronós al vell. També histològicament s'hi aprecien diferències. El cartílag

immadur és més cel·lular i presenta una distribució més difusa a tot el teixit. Les cèl·lules a la capa tangencial són una mica més grans i no tant aplanades com a l'adult. Les zones radial i transicional són més gruixudes. Les columnes de cèl·lules que s'aprecien a les capes profundes del cartílag adult, a l'immadur arriben fins a una localització més superficial i a la zona profunda existeix una distribució en columnes molt més definida. En aquesta zona profunda es poden trobar vasos i les cèl·lules despleguen una activitat mitòtica demostrada a microscòpia òptica i, per les característiques de microscòpia electrònica, amb nuclis picnòtics i vacuoles intracitoplasmàtiques que contenen glicogen. Al cartílag immadur hi hauria una banda per sota la capa tangencial amb activitat mitòtica i una altra més profunda immediatament superior a la zona d'invasió vascular. Al cartílag adult ha cessat l'activitat mitòtica amb el desenvolupament d'una zona calcificada definida, el límit de la qual s'anomena línia de marea o *tidemark* (Mankin HJ et al. 1997).

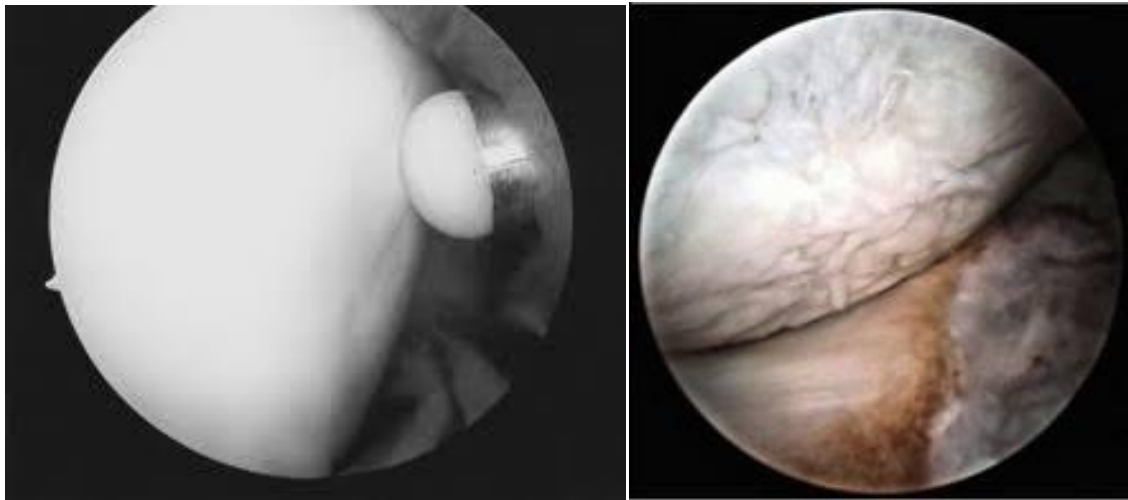


Figura 1.17 A l'esquerra s'observa un cartílag sa amb una coloració blanquinosa. A la dreta s'observa un cartílag diagnosticat d'artrosi amb una coloració groguenca i de superfície irregular.

1.4.3. Degeneració del cartílag articular.

Existeixen diverses causes de degeneració del cartílag articular humà. La més freqüent és la idiopàtica, però relacionada amb l'edat, i per això s'anomena artrosi primària. També hi poden intervenir factors genètics (Williams et al. 1995). Altres causes poden ser malalties inflamatòries, substàncies tòxiques intraarticulars, exògenes o endògenes, o lesions mecàniques. La darrera pot ser deguda a un desgast excessiu associat a alguns esports o treballs (Murray et al. 1999) o un augment de les pressions sobre el cartílag (Chen et al. 1999) per una alteració de la biomecànica de l'extremitat (Solchaga et al. 1992).

1.4.3.1. Factors etiològics.

Artrosi idiopàtica

L'artrosi primària és una malaltia del cartílag no associada a cap alteració articular, traumatisme o deformitat òssia prèvia. Com que clínicament aquest procés es veu influenciat per factors secundaris com l'edat, pes corporal, història de traumatisme i variacions anatòmiques, es considera l'artrosi com una malaltia no inflamatòria de les articulacions sinovials influenciada per múltiples factors en el seu origen i progressió.

La degeneració del cartílag articular comença a la capa superficial i progressa en profunditat (Hembry et al. 2001) fins la seva completa destrucció. La velocitat d'aquest procés és variable, i així a la majoria de casos la persona haurà mort per altres causes abans d'arribar a la destrucció completa del cartílag. En altres casos, una destrucció accelerada porta a la destrucció completa del cartílag i l'articulació de l'os subcondral dels dos extrems de l'articulació.

Els canvis histològics, ultraestructurals i bioquímics del cartílag articular relacionats amb l'edat s'han pogut estudiar en humans a partir d'espècimens quirúrgics per fractures del cap del fèmur. Amb l'edat, disminueix la densitat cel·lular del cartílag però es manté relativament constant durant la vida adulta. Aquests canvis fan les cèl·lules menys efectives en el manteniment de les macromolècules de la matriu i la reparació de la matriu després d'una lesió (Buckwalter et al. 1993).

Traumatismes

Els traumatismes únics es presenten rarament a la clínica habitual. El més freqüent és trobar politraumatismes, impactes contundents que poden lesionar focalment el cartílag i altres estructures veïnes. Les luxacions traumàtiques de la ròtula poden causar també defectes condrials. La detecció d'aquestes lesions és difícil amb la imatge radiogràfica convencional i cal l'aplicació de tècniques d'imatge més avançades com la ressonància magnètica nuclear (RMN), on poden ser identificades i avaluades amb més precisió i detall.

Osteoartritis (OA)

Les lesions de cartílag en aquesta malaltia deriven d'una degeneració progressiva per el desgast del temps o seqüeles de fractures. Una de les causes de l'OA en les articulacions es la degradació de cavitat sinovial de l'articulació i en conseqüència, del cartílag articular. El fet de perdre la capacitat d'amortir les forces de cisalla del moviment articular causa una progressiva atròfia del músculs adjacents i un desgast de les estructures del compartiment afectat. Les principals articulacions afectades són el genoll, l'espatlla i maluc entre d'altres.

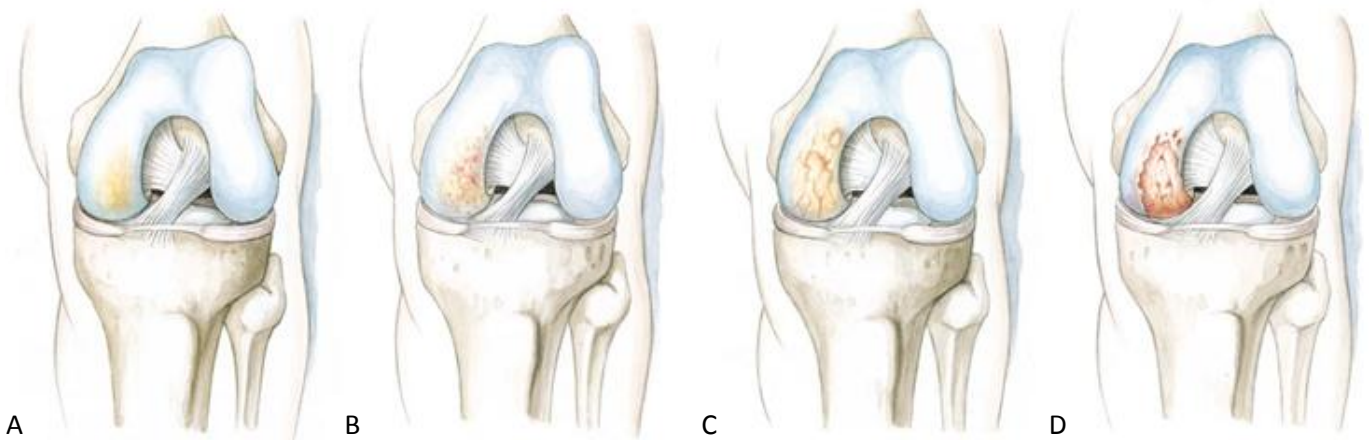


Figura 1.18 Lesions condrials segons l'escala d'*Outerbridge*. Grau 1:A; Grau 2:B; Grau 3:C; Grau 4:D. (Ergelet et al. 2008).

Una de les escales més utilitzades per classificar l'evolució de les lesions osteocondrials derivades de l'OA és la d'*Outerbridge* (Figura 1.18), on hi ha 4 graus d'afectació:

- Grau 0: Cartílag normal.
- Grau 1: Cartílag tou, inflammat i amb canvi de color focal.
- Grau 2: Defecte parcial, presenta fissures a la superfície, no arriba a os subcondral ni excedeix d'1,5 cm de diàmetre.
- Grau 3: Fissures a nivell de l'os subcondral en una àrea amb diàmetre superior a 1,5 cm.
- Grau 4: Os subcondral exposat.

1.4.3.2. Fisiopatologia.

Alguns dels desencadenants del procés artròsic idiopàtic són l'edat o la immobilització perllongada de l'articulació, que lesionaria els porus superficials del teixit i, per altra banda, forces excessives sobre el teixit que superin el seu llindar de resistència, sigui per una sobrecàrrega

puntual o per alteracions biomecàniques de l'extremitat, que de forma continuada sotmeten el cartílag articular a unes pressions excessives. En el cas de la immobilització perllongada, augmentarien els porus superficials del cartílag i l'entrada de molècules nocives al teixit que en condicions normals no podrien entrar per la seva mida. L'aigua entraria al teixit trencant les fibres de col·lagen i convertint les lesions en irreversibles i progressives.

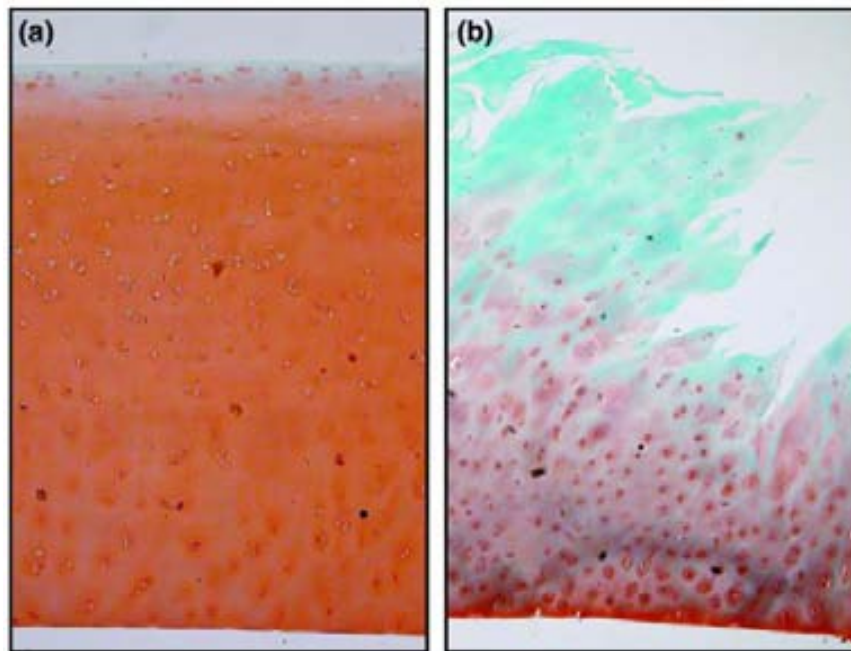


Figura 1.19. Histologia de cartílag hialí tenyida amb safranina O. a: Cartílag sa ; b: cartílag osteoartrític.

Quan la xarxa fibril·lar mostra canvis patològics, aquests són irreversibles i l'articulació ha iniciat l'evolució cap a l'artrosi. Les capes profundes encara no estan afectades i tenen condrocits organitzats en columnes de cèl·lules actives amb una matriu intercel·lular normal. Pot existir una reducció de PG i col·lagen a la matriu pericel·lular. La pèrdua de PG fa que existeixi una disminució de la tinció amb Safranina O (figura 1.19) a les zones superficials però no a les profundes, especialment al voltant dels condrocits (Cruess 1971). Es produeix un desequilibri entre síntesi i secreció que porta a una disminució de la matriu cartilaginosa i a la producció de GAG incomplets i per tant inútils (Matyas et al. 1995).

Amb l'augment de la gravetat de la malaltia, la síntesi tendeix a disminuir, essent normal a les capes profundes que encara no estan afectades. La progressió de la destrucció del cartílag es manifesta per l'aparició d'acúmul·ls de fibres desorganitzades i fissures. A la fibril·lació de la superfície amb desaparició de condrocits s'hi afegixen fissures i fibres petites de col·lagen

degradades. Sota el cartílag normal de la zona radial, al costat de superfície amb fibril·lació, es troben quists sense continuïtat amb la superfície de la zona veïna amb fibril·lació.

En les fases avançades prossegueix la disminució de PG, GAG i àcid glucurònic (Brocklehurst et al. 1984) per disminució de la síntesi. Hi ha clústers de cèl·lules. Les esclotxes arriben a la capa intermèdia. La superfície articular presenta ara fissures, partícules de detritus, cèl·lules inflamatòries i una xarxa de fibrina. Tot plegat afecta la resistència i propietats biomecàniques del cartílag articular. La divisió cel·lular per intentar sintetitzar més matriu es produeix de forma desorganitzada. Això dona clústers de cèl·lules en els quals algunes cèl·lules tenen nuclis anormals. La divisió cromosòmica patològica podria explicar la síntesi de material anormal per la matriu. També la inflamació de la sinovial actua en aquest sentit alliberant productes que acceleren el procés destructiu del cartílag, com seria el cas de les interleuquines. El contacte directe de la matriu cartilaginosa amb el líquid sinovial crea una sinovitis local per l'alliberament de restes de cartílag a l'articulació, que provoca l'alliberament d'enzims de la membrana sinovial que destrueixen encara més la matriu cartilaginosa.

A totes les fases de l'artrosi, hi ha un augment del contingut d'aigua de la matriu. Això provoca una pèrdua de resistència a la pressió, a més de fissures provocades per forces tangencials. Aquest augment d'aigua seria degut a que queden més grups hidrofílics lliures en trencar-se els PG o quedar molècules de PG més petites amb grups hidrofílics lliures (Mankin et al. 1975).

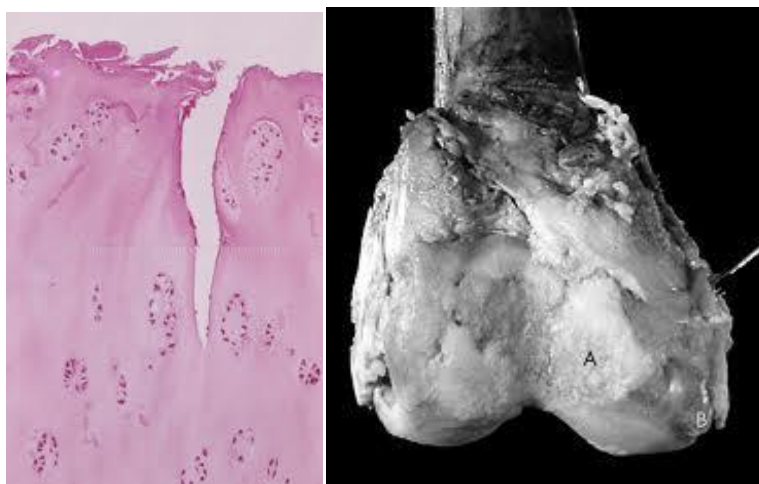


Figura 1.20. A l'esquerra, histologia de cartílag hialí tenyida amb Hematoxilina-Eosina a l'esquerra, on s'observa una fissura del cartílag seguint l'orientació de les fibres de col·lagen i l'organització columnar cel·lular. A la dreta, un còndil afectat per osteoartritis, fase final de l'artrosi degenerativa.

A continuació es llista tota una sèrie de lesions que s'observen a nivell histològic al cartílag artròsic (Meachim 1980):

- Fissuració del cartílag (figura 1.20) seguint la mateixa orientació de les fibres de col·lagen que es podria interpretar com una "fractura de fatiga" de la xarxa col·làgena i recolzaria l'existència d'un procés de fatiga de materials com a causa de l'artrosi.
- Pèrdua de cartílag superficial sense fissuració que es podria relacionar amb un mecanisme abrasiu o de desgast en la hipòtesi etiològica del procés artròsic.
- Fissuració horitzontal a nivell de la *tidemark* o línia de marea, que correspon al límit entre el cartílag calcificat i no calcificat. Això suposaria una força de cisallament entre la capa no calcificada, que té una certa elasticitat en ser sotmès a càrrega, i la capa calcificada, més rígida, que no pot seguir la capa que té a sobre en els moviments de deformació.
- Necrosi de condrocits que es manifesta com una manca de tinció del nucli a la histologia.
- Aparició de clústers de cèl·lules que contrasta amb la necrosi que pateixen alguns condrocits en el mateix cartílag. Es tracta d'una reacció de proliferació cel·lular a partir de condrocits que s'han mantingut viables.
- Zones de fibrosi que alternen amb teixit ossi quan la pèrdua de teixit cartilaginós arriba a l'os fins el punt de produir un sagnat que permeti la proliferació de fibroblastes.
- Pèrdua completa de la capa cartilaginosa de l'articulació i contacte del teixit ossi subcondral amb la cavitat sinovial. Aquesta seria la fase final (figura 1.20) de l'artrosi amb una articulació entre els extrems ossis.

1.4.4. Autoreparació del cartílag articular.

El cartílag articular no té la capacitat de reparació d'altres teixits per continuar essent funcional, en gran part degut a la seva avascularitat. En general, s'accepta que les laceracions del cartílag fins la zona calcificada no són reparables (Bentley et al. 1984). Però quan una lesió penetra fins l'os subcondral, les cèl·lules mesenquimals de l'os poden crear un teixit de regeneració fibrocartilaginós (figura 1.21) format principalment per col·lagen del tipus I (Furukawa et al. 1980). En altres teixits del sistema esquelètic es forma col·lagen de tipus I al defecte creat per la lesió. En canvi el cartílag articular està format, sobretot, per col·lagen de tipus II que li confereix les seves especials característiques. El teixit cicatricial format en aquest procés no conté col·lagen de tipus II en la quantitat ni forma adequades, ni tampoc PG i altres molècules que formen el cartílag articular sa.

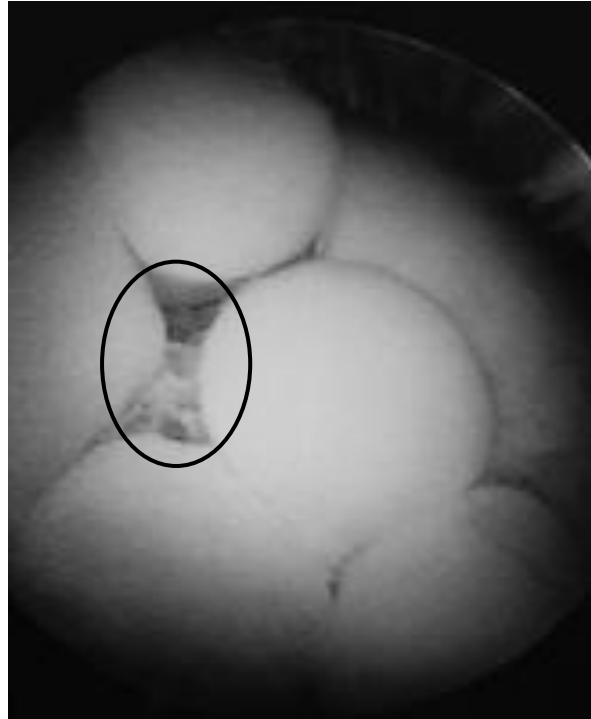


Figura 1.21. Encerclat en negre, fibrocartílag reparat després d'una intervenció quirúrgica. El cartílag que es forma entre els implants autòlegs de cartílag, és fibrocartílag.

En altres teixits, quan es produeix una lesió, s'inicia una reacció inflamatòria i pels vasos arriben cèl·lules que inicien la reparació de la lesió. Això no passa al cartílag perquè no té vasos. Aquesta resposta inflamatòria a altres teixits indueix la migració de cèl·lules indiferenciades que començaran la remodelació de la lesió i faran desaparèixer el teixit necròtic. Al cartílag tampoc existeixen aquestes cèl·lules indiferenciades, encara que poden arribar a través de la membrana sinovial al lloc de lesió (Hunziker et al. 1998).

A llarg termini no s'aprecia guariment ni augment de la lesió. Després d'una lesió del cartílag o a l'artrosi, alguns condrocits del cartílag adult sí que responen augmentant la seva activitat metabòlica (Bentley et al. 1984) però la seva resposta és limitada i no hi ha evidència que aquestes cèl·lules puguin migrar cap el lloc de la lesió. A més, aquests condrocits adults probablement tenen una capacitat limitada per incrementar la síntesi de matriu. La seva activitat metabòlica és suficient per mantenir la matriu que els envolta però no per reparar un defecte extens. Es pot concloure que la resposta reparadora que es dona en el si del cartílag quan es lesiona prové de tres fonts: os, sinovial i cartílag. Malgrat la resposta, no és capaç de tornar el cartílag al seu estat original.

1.5. Teràpies establertes per la regeneració de cartílag articular.

Existeixen algunes teràpies de regeneració de cartílag, encara que no són del tot satisfactòries per als pacients i són tractaments molt cars. Un exemple és el Trasplantament Autòleg de Condròcits (TAC), que pot arribar a costar uns 30000 dòlars (Clar et al. 2005). Bàsicament, s'extreu cartílag del pacient, s'expandeix *in vitro* per tenir una massa cel·lular suficient i es reintrodueixen les cèl·lules a la zona afectada. Existeix també l'alternativa del transplantament de cartílag, també anomenat mosaicoplàstia. Aquestes tècniques tenen uns resultats acceptables, però només en petits defectes, per això es necessita la medicina regenerativa per generar teixits a mida per les lesions cartilaginoses més habituals. A la taula 1.12 es resumeixen les teràpies que existeixen per al tractament de defectes focals en el cartílag articular.

Taula 1.12. Teràpies mèdiques i quirúrgiques per a defectes focals de cartílag articular amb els respectius inconvenients. (Williams et al. 2007)

Mètode	Tècnica	Inconvenients
I - Rentat artroscòpic		
Rentat	Irrigació de l'articulació amb solucions de NaCl, Ringer o Ringer lactat	Remissió del dolor durant poc temps No hi ha evidència clínica ni biològica de reparació
II – Desbridament		
Desbridament	Desbridament mecànic del teixit cartilaginós danyat	Inestabilitat de l'articulació Recidiva
Condroplàstia tèrmica	Desbridament amb calor o radiofreqüència	Necrosis per dany tèrmic
III – Tècniques d'estimulació medul·lar		
Abrasió	Accés quirúrgic a l'os subcondral amb reparació espontània induïda	Teixit de reparació fibrocartilaginós Mobilitat restringida
Microfractura		
IV – Trasplantament		
Autòleg	Reemplaçament del cartílag perdut per empelt propi	Baixa fixació de l'empelt Mobilitat restringida per inflamació Disponibilitat i morbiditat del pacient
Al·logènic	Reemplaçament del cartílag	Rebuig immunològic

	perdut per empelt d'un donant	Transmissió de malalties Manufectura i conservació del teixit congelat
V – Teràpia cel·lular		
Transplantament Autòleg de condrocits (TAC)	Biòpsia del pacient Cultiu <i>in vitro</i> de cèl·lules i reimplantació en el defecte sota una capa de periosti	Tractament car Dues cirurgies Possible dany al cartílag adjacent Degeneració a llarg termini Capacitat per admetre integració cel·lular reduïda

Com s'ha explicat anteriorment, la gran majoria dels productes es basen en condrocits expandits. D'entre les teràpies cel·lular existents, en fase de desenvolupament o comercials, resumides a les taules 1.4., 1.5. i 1.6., la més coneguda i de la que més dades es disposa és de Carticel (Genzyme).

Carticel (Genzyme) va ser la primera teràpia cel·lular autòloga aprovada per la FDA i comercialitzada als EUA i Europa. Aquesta tècnica, descrita per primer cop l'any 1994 per Brittberg (Brittberg et al. 1994) consisteix en l'aïllament, mitjançant digestió enzimàtica d'una biòpsia del propi pacient, de condrocits autòlegs. Aquests s'expandeixen *ex vivo* i son retornats al pacient, segons mostra la figura 1.22.

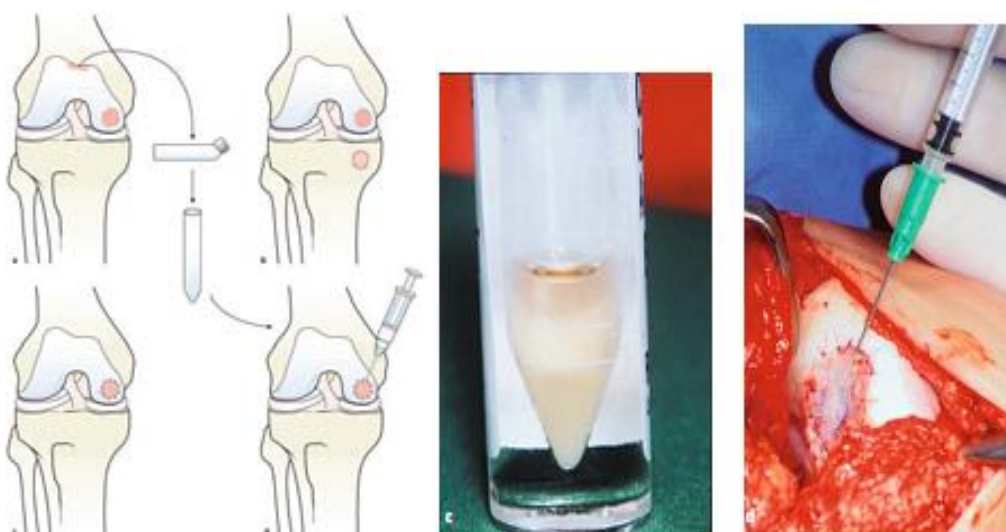


Figura 1.22 Trasplantament autòleg de condrocits. Representació esquemàtica a l'esquerra. Pellet cel·lular després de l'expansió e injecció al defecte recobert per una capa de periosti, al centre i la dreta.

Les cèl·lules son cultivades sota unes condicions dissenyades per duplicar-se ràpidament sense perdre l'habilitat de reexpressar el fenotip de cartílag diferenciat un cop s'implanten al defecte. El manteniment de la funció és essencial per al funcionament del teixit *in vivo*. Els condrocits autòlegs cultivats són infiltrats, en forma de suspensió (figura 1.22), al defecte condral, on prèviament s'ha col·locat una membrana de periosti autòloga. El resultat és la regeneració parcial del teixit, obtenint un cartílag pseudohialí que expressa proteoglicans i col·lagen tipus II. La tècnica presenta certs avantatges i inconvenients resumits a la taula 1.13.

Taula 1.13 Avantatges i inconvenients del trasplant autòleg de condrocits. (Wood et al. 2006)

Avantatges	Inconvenients
Teixit autòleg	Cobertura incompleta de la lesió
Transplantament de teixit pseudo-hialí	Morbiditat associada a la biòpsia
Es pot realitzar artroscòpicament	Disponibilitat limitada de donants
	Lesió de l'os subcondral
	Superfície del cartílag irregular

Tots aquests inconvenients i l'aparició de nous biomaterials compatibles per a la regeneració de cartílag han fet aparèixer una sèrie de productes, de moment només disponibles a Europa. Els productes que es troben comercialitzats a Europa i als EUA són diferents ja que la legislació és diferent. Als EUA només es pot trobar el Carticel com a producte de teràpia cel·lular acceptat per a la regeneració de cartílag. En canvi a Europa han aparegut noves teràpies basades en la colonització i maduració de condrocits a dintre matrius biocompatibles que s'implanten passat un temps al defecte condral (Erggelet et al. 2008).

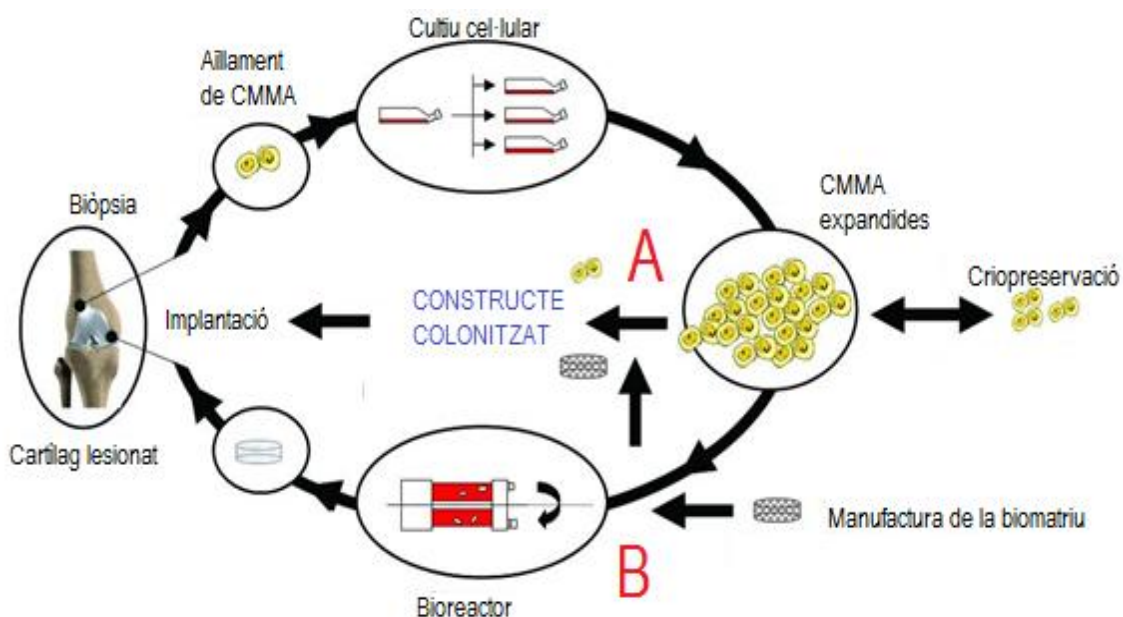


Figura 1.23 Procés d'obtenció de constructes per a la regeneració de cartílag articular. Ruta A: Sense cultiu i maduració en bioreactor. Ruta B: Amb cultiu i maduració en bioreactor.

L'estratègia de cultiu és simple. Es biòpsia el teixit, cartílag en aquest cas, s'aïllen els condrocits, i s'expandeixen *in vitro* fins obtenir el nombre de cèl·lules necessàries per a portar a terme el tractament (figura 1.23-Ruta A sense utilització de biomatriu). Com a mesura preventiva i de futur, s'emmagatzemen les cèl·lules en un banc de cèl·lules per a possibles necessitats de futur. Les cèl·lules expandides es colonitzen dintre d'una biomatriu dissenyada per a regenerar cartílag, es cultiva a dintre d'un bioreactor amb unes condicions de cultiu específiques, i un cop el constructe es considera apte, s'implanta al defecte focal.

Alguns exemples són els llistats a la taula 1.5, com Bioseed C, Biocart II i Cares entre d'altres. Els polímers es basen en matrius col·lagenes (tipus I i III principalment), àcid hialurònic o PGA/PLA. En concret, Bioseed C ha estat desenvolupada per *BioTissue Technologies*, on una matriu tridimensional colonitzada amb condrocits autòlegs i madurada en un bioreactor durant un període de temps establert (figura 1.23 Ruta B), és implantada mitjançant fixadors com la fibrina, impactació o fixació transòssia (figura 1.24).

Des de 2001 s'han portat a terme diversos assaigs clínics controlats i estudis de seguiment de 2 anys que han demostrat una regeneració del cartílag articular amb una estabilitat mecànica superior a la tècnica de Carticel i evitant els problemes que presenta aquest últim, excepte la comorbiditat per la biòpsia (Ossendorf et al. 2007).

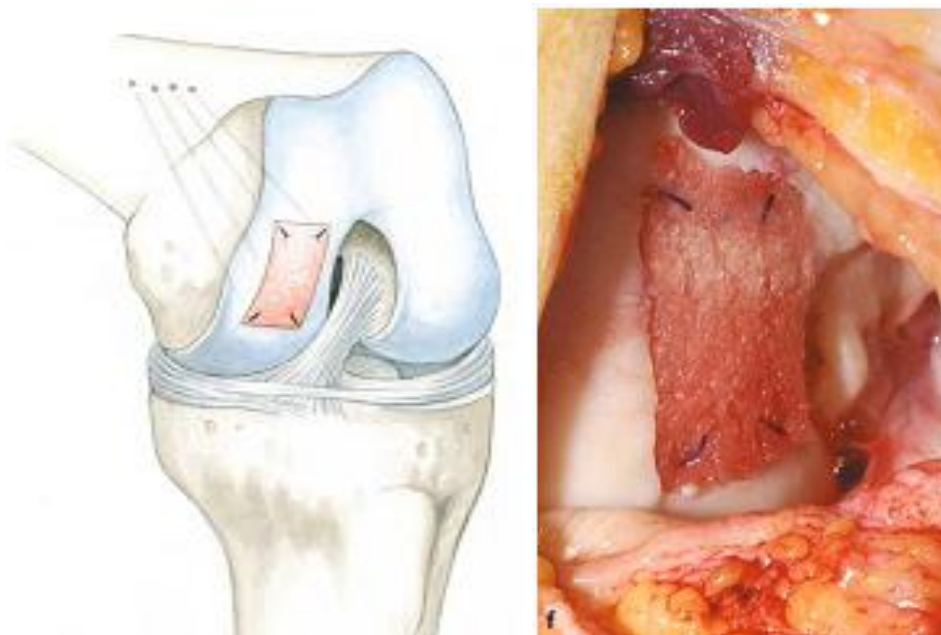


Figura 1.24 Matrius Bioseed C colonitzades amb condrocits, implantades mitjançant una fixació transòssia (Erggelet et al. 2008).

1.5.1. Noves aproximacions

La introducció de noves teràpies per al cartílag ha comportat també la identificació de nous reptes a solucionar com l'aparició de fibrocartílag (Wood et al. 2006), l'expansió cel·lular insuficient (Mandl et al. 2004) i problemes quirúrgics (Manfredini et al. 2007). Per aquests motius s'han buscat noves aproximacions terapèutiques. Durant la dècada dels 90 i principis d'aquest segle, s'han anat desenvolupant i comercialitzant el, ja esmentat, TAC, però ja s'ha vist que presenta problemes. És per això que una nova generació de productes s'han desenvolupat amb la combinació de la tecnologia cel·lular amb la de biomatrius, derivant en nous productes que es poden anomenar Trasplantament Autòleg de Condròcit Assistit per Matrius (TACAM). Breument, es realitza el mateix procediment que amb el TAC, però les cèl·lules són vehiculitzades per una matriu, ja sigui biològica o sintètica, tal i com s'ha explicat en l'estratègia general de l'enginyeria de teixits a l'apartat 1.1.1 i la figura 1.3. Dintre dels components que s'utilitzen, poden existir variacions tant a nivell cel·lular, amb diferents fonts d'on obtenir les CMMA, com de matriu, amb diferents orígens (natural o sintètica). Si es volen aplicar aquestes teràpies en humans, s'han de provar primer en experiments preclínic per avaluar la seva eficàcia i seguretat.

A la taula 1.14. es mostra un resum de les diferents estratègies estudiades durant els últims 15 anys en el camp de la medicina regenerativa. Veient la taula 1.14. es pot afirmar que un dels polímers més utilitzats durant els primers anys de l'enginyeria tissular i la medicina regenerativa ha estat la malla no trenada de PGA. S'han utilitzat diferents estratègies per a demostrar la capacitat condrogènica d'aquests constructes, tals com la implantació subcutània en ratolins immunodeprimits o en defectes osteocondrals en animals model com el conill o la rata, és a dir, aproximacions *in vivo*.

Cal remarcar que la majoria de la recerca que s'ha fet, s'ha limitat a la experimentació *in vitro* en diferents sistemes de colonització. Hi ha molts exemples de tipus de bioreactor, entre els que es troben el flascó agitat, el bioreactor rotatori o els sistemes de perfusió (Sittinger et al. 1994; Freed et al. 1997; Freed et al. 1998). Aquesta vessant més bàsica pot ser explicada per la dificultat tècnica i econòmica, de portar a terme un assaig en animals de gran mida per mimetitzar al màxim les condicions humanes.

Taula 1.14. Estratègies utilitzades en el camp de la medicina regenerativa i enginyeria tissular per a la regeneració de cartílag.

Font cel·lular	Biomatriu	Estratègia de cultiu	Referència
Cartílag boví	Malla de PGA no trenada	Flascó agitad (6 setmanes)	(Freed et al. 1994)
Cartílag boví	Malla de PGA no trenada	Implantació subcutània en ratolins immunodeprimits (12 setmanes)	(Puelacher et al. 1994)
Cartílag lapí	Malla de PGA no trenada	Implantació en defectes cartilaginosos en conills (7 setmanes)	(Vacanti et al. 1994)
Cartílag lapí	Malla de PGA no trenada	Perfusió (4 setmanes)	(Dunkelman et al. 1995)
Cartílag boví	Malla de PGA no trenada	Bioreactor rotatori(7 mesos)	(Freed et al. 1997)
Cartílag caní	Esponja de Col·lagen tipus I-GAG Vs Esponja de Col·lagen tipus II-GAG	Implantació en defectes cartilaginosos en gossos (15 setmanes)	(Nehrer et al. 1998)
Cartílag caní	Matriu de Col·lagen tipus I-GAG Vs Matriu de Col·lagen tipus II-GAG	Estàtic en plaques de micropous (2 setmanes)	(Lee et al. 2000)
Cartílag boví	Malla de PGA no trenada	Estàtic en placa /Flascó agitad/ Bioreactor rotatori (4 setmanes)	(Gooch et al. 2001)
Cartílag boví	Esponja de PLGA	Implantació subcutània en ratolins atímics (8 setmanes)	(Sato et al. 2001)
Moll d'os lapí	Esponja de PLGA	Implantació en defectes cartilaginosos en conills (4-12 setmanes)	(Uematsu et al. 2005)
Cartílag murí	Esponja de PLGA	Bioreactor rotatori (4 setmanes)	(Emin et al. 2008)
Cartílag oví	β -TCP (Tricalci fosfat)	Cultiu <i>in vitro</i> 15 dies+ Implantació en defectes cartilaginosos ovins(12-24 setmanes)	(Guo et al. 2004)

En aquest treball s'utilitza una biomatriu de PLGA amb unes característiques que es defineixen i caracteritzen al capítol 4 en funció de l'assaig preclínic que es dissenya i discuteix més endavant. A la taula 1.14 es pot observar que la majoria d'aproximacions realitzen un cultiu *in vitro* per a la maduració del teixit i la seva diferenciació, prèvia a una possible implantació en un animal model per demostrar la hipòtesi que es plantegi. En el cas d'aquest treball, no es realitza cap cultiu en bioreactor, tret del temps necessari per a la colonització de les CMMA a dintre del PLGA.

1.6. Estudis preclínic

Els estudis preclínic són aquells que es realitzen a una fase prèvia als assaigs clínics en humans pel desenvolupament d'una determinada teràpia. A la taula 1.1 ja s'ha comentat que aquests representen els estadis inicials del procés que s'ha de portar a terme per a la comercialització d'un nou producte per a ús humà, en canvi, tal i com s'ha vist durant la secció 1.1.1. venen precedit per a una sèrie d'experiments i plantejaments previs ja explicats com la tria de les cèl·lules i la matriu, en el cas d'un producte de medicina regenerativa per a regeneració de cartílag, i tota l'estratègia que s'ha de planificar prèviament a qualsevol experimentació. Tota la planificació i experimentació s'ha de portar a terme un cop es tingui clar l'estudi preclínic a realitzar.

No existeix cap base de dades d'estudis preclínic, però si una pàgina web on es recullen la majoria d'assaigs clínics que es realitzen arreu del Món (www.clinicaltrials.gov). És indubtable l'interès de les empreses i d'alguns organismes públics per al desenvolupament de teràpies basades en la medicina regenerativa. Les CMMA han despertat un interès a la majoria de països del món. A la figura 1.25 es pot observar com la majoria d'assaigs clínics relacionats amb cèl·lules mare mesenquimals es porten a terme als Estats Units (47), Europa (51) i la zona Asiàtica (68).

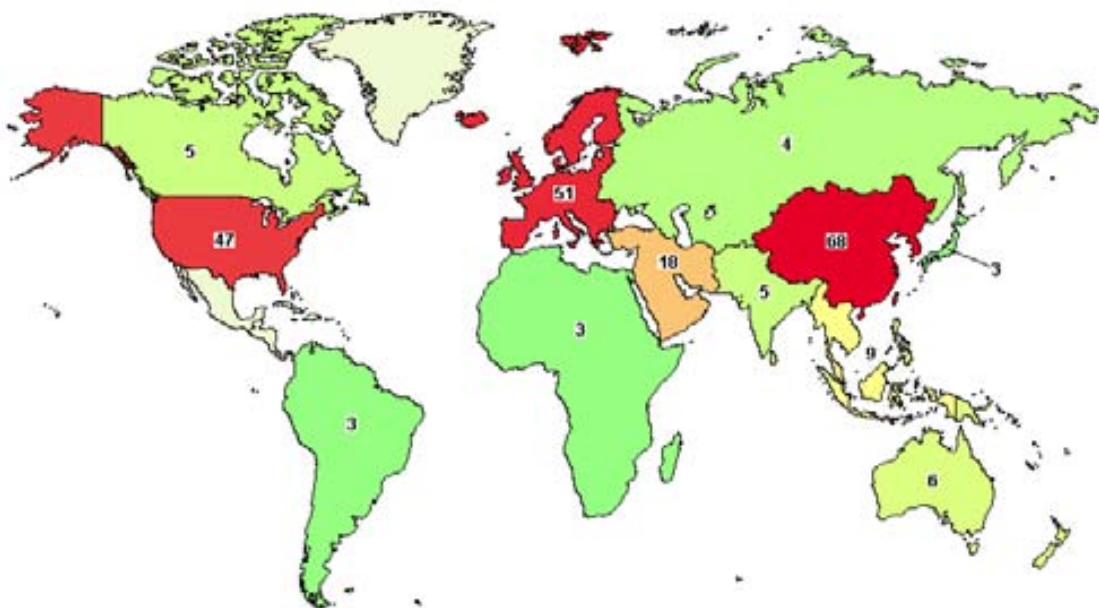


Figura 1.25. Distribució geogràfica dels assaigs clínics relacionats amb cèl·lules mare mesenquimals registrats a la web <http://clinicaltrials.gov>. Als requadres en negreta es quantifiquen el nombre d'assaig per cada zona geogràfica. Consultat per últim cop el 9 de Juliol de 2012.

Els objectius principals dels estudis preclínics són demostrar la hipòtesi de treball en un animal model i demostrar la seguretat del procés. Tradicionalment es realitzen una sèrie d'estudis farmacològics, toxicològics per veure la seguretat del procés i identificar qualsevol toxicitat relativa al medicament que s'està provant. Un punt important a determinar en els estudis preclínics és la relació dosi-efectivitat, per establir unes certes dosis inicials per a futurs assaigs clínics o posteriors assaigs en models animals. En el capítol 2 s'estableixen els objectius específics d'aquest treball, pel que fa a l'estudi amb animals, en base a les recomanacions que realitza la EMA per a realitzar assaigs preclínics en models animals.

Els estudis preclínics per al desenvolupament de nous medicaments o teràpies, consten en gran part d'estudis amb animals models. Són importants ja que són clau per a la determinació de l'eficàcia i la seguretat dels nous productes desenvolupats, abans de passar a un assaig clínic amb humans. S'ha de tenir molt en compte, utilitzar i mimetitzar l'ús clínic de la teràpia per a reproduir la situació que es donarà als humans (Lee et al. 2010).

En alguns casos, elegir l'animal model per a una malaltia és específic per a cada malaltia. No hi ha cap animal model general, l'elecció ha d'estar justificada per la conveniència general al desenvolupament del producte. Un cop seleccionat el model, aquest s'ha de validar per evitar variabilitat inherent en els experiments a conduir (Chu et al. 2010).

És important realitzar un estudi preliminar per observar les limitacions que poden presentar certes espècies. L'estudi ha d'incloure paràmetres com la disponibilitat de l'animal, aspectes ètics, costos de manteniment, capacitat tècnica per portar a terme l'assaig, informació histològica i les limitacions estadístiques.

Per a que els resultats obtinguts en els estudis amb animals serveixen per donar suport a l'ús clínic del producte, aquest ha d'haver estat testat en la seva formulació final sempre que sigui possible. Altres estudis no preclínics poden ser duts a terme per a donar suport a l'ús clínic del producte, com els experiments de diferenciació *in vitro*, la integració dels constructes o l'estabilitat mecànica de les matrius i dels constructes entre d'altres (Lee et al. 2010).

Un cop escollit l'animal model s'ha de dissenyar l'estudi preclínics en funció de les necessitats i la disponibilitat de recursos. És diferent fer un estudi amb ovelles, que amb cavalls, els costos poden fer que l'experiment tingui ràtio cost/benefici molt alta. L'estudi ha d'incloure tota

una sèrie d'anàlisis de seguiment durant l'experimental, una recollida de dades sistematitzada i un anàlisis postmortem exhaustiu portat a terme mitjançant la tècnica del doble cec, tant per a l'avaluació macroscòpica com microscòpica dels resultats (Chu et al. 2010). En el l'apartat 1.6.1 es discuteix quin és el model animal més adient per la generació de lesions osteocondrals.

En el cas de medicina regenerativa, com en aquest treball, on es prova una combinació de cèl·lules més una biomatriu, s'han de realitzar proves addicionals per confirmar la seguretat necessària per poder iniciar experiments amb humans. Per exemple, el potencial de les cèl·lules emprades de transformar-se en cèl·lules malignes o el risc de ruptura o inestabilitat de la biomatriu un cop implantada. L'anàlisi de risc d'aquests productes de teràpies avançades ha de cobrir tots els passos del procés de producció com la font cel·lular (autòleg, al·logènic), la capacitat de produir una resposta immunitària, la proliferació i diferenciació, la combinació de molècules bioactives o biomaterials, la funcionalitat a llarg termini, la via d'administració o la dosi, entre d'altres. Tots aquest aspectes es poden avaluar en els estudis preclínic. Un dels principals obstacles que presenten aquestes teràpies és l'avaluació de la interacció cèl·lula-matriu i el constructe amb el teixit a regenerar. Aquestes interaccions generen una complexitat a nivell tridimensional, en quant a la heterogeneïtat de la composició final i el remodelat del constructe després de la implantació. Aquesta complexitat comporta una dificultat afegida en la manufactura ja que les proves *in vitro* que es realitzin per a predir la seguretat clínica del medicament, poden no ser útils un cop s'hagi produït la remodelació en el teixit a regenerar. Es necessiten, llavors, dades *in vitro* i *in vivo* per assegurar l'eficàcia i la seguretat d'aquests constructes. Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, una caracterització extensa d'aquests constructes és necessària, a nivell molecular, cel·lular, puresa, viabilitat cel·lular, esterilitat i altres paràmetres necessaris per predir el comportament un cop s'utilitzi en humans. Llavors son necessaris diverses proves posteriors a la implantació per comprovar que les cèl·lules no han migrat i que la descomposició/reabsorció del biomaterial no afecta significativament a les propietats estructurals i funcionals de teixit que s'intenta regenerar (Lee et al. 2009).

Tota la caracterització que s'ha esmentat anteriorment s'ha de plantejar des d'un primer moment en el procés de desenvolupament del medicament per tenir una visió global prèvia del procés de producció, per determinar a priori els principals obstacles i complicacions que poden anar apareixent durant l'experimentació preclínica. La progressió exponencial del nombre de productes de medicina regenerativa en desenvolupament es pot observar en l'aparició de guies i

estàndards específics per a la caracterització de nous biomaterials en animals (F2027) o la guia per l'avaluació *in vivo* de la regeneració de cartílag mitjançant materials implantables (F2451), elaborats per l'Associació Americana de d'Experimentació i Materials (*American Society for Testing and Materials-ASTM*) (Lee et al. 2009). També s'observa aquesta progressió de la tecnologia en el nombre de companyies que es troben encara en fases preclíniques de desenvolupament. Segons un estudi del 2008, als EUA, unes 63 companyies es trobaven en fase preclínica per desenvolupar diferents productes de medicina regenerativa o enginyeria tissular, amb un volum d'inversió de 306 milions de dòlars (Lysaght et al. 2008). Aquestes companyies utilitzen principalment models *in vivo* per portar a terme les fases finals de l'experimentació preclínica, utilitzant models animals.

Així doncs, els models animals són clau en els estudis preclínic ja que són els elements de l'experimentació preclínica que més dades aporten i més fiables són. Tot i així, els models tenen limitacions ja que no reproduïxen exactament els que passa en els humans, no presenten la mateixa fisiologia ni el mateix metabolisme. La majoria d'aquests nous medicaments no tenen establerts uns models animals específics per a la seva experimentació, llavors una de les decisions clau per al disseny de l'estudi preclínic serà la tria del model animal per poder estudiar la regeneració del teixit diana que escollim, en aquest treball, el cartílag hialí.

En concret, dintre del camp de la medicina regenerativa aplicada al tractament de l'osteoartritis, el medicament basat en CMMA més avançat és un producte de l'empresa *Osiris Therapeutics* (EUA), Chondrogen®, una suspensió de CMMA procedents de moll d'os de donants, és a dir, una teràpia heteròloga. Aquestes cèl·lules es resuspenen en una solució d'àcid hialurònic i s'infiltra als pacients. A la web de www.clinicaltrials.gov, una de les bases de dades d'assaigs clínics més importants del món, a la secció del producte en fase clínica de Chondrogen® hi ha referenciat l'assaig preclínic que es va realitzar en l'espècie caprina per avaluar l'efecte reparador i regenerador de 5 mL d'una suspensió de CMMA provinents de moll d'os en una solució d'àcid hialurònic, a una concentració cel·lular de $2E+06$ CMMA/mL (Murphy et al. 2003). A l'estudi s'analitza la seguretat del procés i l'eficàcia, avaluant només clínicament i histològicament els resultats post-quirúrgics dels 9 animals que es van tractar amb el producte desenvolupat.

En el següent apartat es valora els diferents models animals per poder assajar la regeneració de les lesions osteocondrals mitjançant el constructe que s'ha dissenyat amb CMMA provinent de diferents orígens i un biopolímer que es posa a punt durant aquest treball.

1.6.1. Models animals

Malgrat que es disposa de tecnologia *in vitro* per estudiar diferents aspectes del procés de desenvolupament d'un nou producte basat en la medicina regenerativa, podent-se estudiar la funció dels condrocits i les CMMA, o caracteritzar les interaccions entre cèl·lules i matrius, és necessària la utilització de models animals.

Amb els models animals es pot estudiar el creixement cel·lular i diferenciació en el microambient de l'articulació en conjunt amb els teixits adjacents, es pot estudiar també la seguretat local i sistèmica, la funció cel·lular un cop implantat el producte, les propietats mecàniques del neocartílag i els efectes a llarg termini del remodelat atribuït al producte implantat. Durant els últims anys s'han desenvolupat diversos estudis en animals de laboratori per a la regeneració de cartílag hialí. Alguns dels exemples es poden trobar a la taula 1.15.

Taula 1.15. Principals models animals emprats per a la regeneració de cartílag hialí.

Model animal	Referència
Roedors (ratolí i rata)	(Fujisato et al. 1996)
Conill	(Brittberg et al. 1996)
Porc	(Jiang et al. 2007)
Gos	(Breinan et al. 1997)
Cabra	(Brehm et al. 2006)
Ovella	(Russlies et al. 2005)
Cavall	(Litzke et al. 2004)

Tot i l'existència de diferents classes de models animals, no existeix un model perfecte per a totes les fases de desenvolupament. La Societat Internacional d'Experimentació en Cèl·lules Mare (*International Society in Stem Cell Research – ISSCR*) recomana la utilització d'animals petits (ratolins, conills) per a les fases inicials de la investigació, corresponents al cribat inicial de materials, cèl·lules i estratègies, i llavors utilitzar els animals grans (ovelles, cabres o cavalls) per a estudis de confirmació de l'efectivitat del tractament desenvolupat.

A la figura 1.26, es poden observar les articulacions femorotibials de diferents animals. A primera vista s'observa una major similitud entre l'humà i la cabra i ovella, per la forma d'articular els còndils amb la meseta tibial. Aquest i d'altres factors s'han de tenir en compte a l'hora d'escollir el model animal amb el qual es portaran a terme els experiments preclínic.



Figura 1.26. Imatges radiogràfiques (projecció lateral) de l'articulació femorotibial de diferents animals. (Bellemans 1999)

A l'hora de l'elecció del model animal s'ha de tenir en compte diversos aspectes per valorar les diferents alternatives. Entre d'altres, es valora l'edat de maduració esquelètica i el rang d'edat amb la qual es pot treballar amb l'animal. El potencial de reparació del cartílag i la resposta als diferents tractaments varia en funció de l'edat de maduració esquelètica de l'animal. Com a exemple es pot considerar la utilització de periosti en diferents models de regeneració de cartílag. Aquest té el potencial de regenerar cartílag, però en conills aquesta propietat és inversament proporcional a l'edat, i a partir dels 6-12 mesos disminueix considerablement. Aquesta relació entre l'edat de maduració i la regeneració és deguda als canvis de composició de la matriu cartilaginosa, en el contingut de cèl·lules, de lípids, de precursors cartilaginosa del periosti, al llarg de la vida dels animals (Reinholz. et al. 2004).

Un altre dels aspectes que s'ha de valorar és el grossor de la lesió experimental que es realitzarà. Cada model animal presenta un grossor característic, que determinarà molts aspectes

del disseny inicial del experiment, ja que si es planteja una estratègia de CMMA colonitzades en matriu, com en aquest treball, la forma, l'alçada i la superfície total de la matriu dependrà del grossor del cartílag. A la taula 1.16 es pot observar la variabilitat que hi ha entre els diferents grossors de cartílag dels diferents models animals i la maduresa dels mateixos. Cap espècie presenta un cartílag amb un gruix similar a l'humà, però el cavall és la que més s'hi aproxima. En el cas de la maduresa esquelètica és bastant variable entre espècies.

Taula 1.16. La maduresa esquelètica, gruix del cartílag i la mida de lesió crítica (diàmetre) en diferents espècies. (Ahern et al. 2009)

Espècie	Murina	Lapina	Canina	Porcina	Ovina	Caprina	Equina	Humana
Gruix cartílag (mm)	0,1	0,3	0,95-1,3	1,5	0,4-1,68	0,8-2	1,75-2	2,22
Maduresa esquelètica	Sempre	16-39 setmanes	12-24 mesos	42-52 setmanes	48-36 mesos	48-36 mesos	60-72 mesos	14-20 anys
Lesió crítica (mm)		3	4	6	7	6	9	-

Un dels aspectes més importants és la mida crítica de la lesió que es genera artificialment per avaluar les diferents teràpies que es vulguin aplicar per a la regeneració d'aquesta. S'ha vist que les lesions de 3mm de diàmetre en el model caprí es reparen espontàniament. En canvi, si la lesió arriba fins als 6mm no hi ha reparació ni regeneració espontània. Malgrat que no existeix cap animal model on la lesió de cartílag hialí sigui igual que en humans, s'ha d'escollir el millor animal model en base als criteris ja esmentats i d'altres com el cost del experiment, tant a nivell de preu de l'animal com de l'estabulació, la dificultat en la manipulació del animals, la possibilitat d'accés quirúrgic i la disponibilitat de personal qualificat, entre d'altres. Altres característiques intrínseques de l'animal s'han de tenir en compte com l'anatomia del genoll en relació a les propietats biomecàniques de càrrega de l'animal, és a dir, en quina zona es realitza una major o menor càrrega durant l'exercici habitual de l'animal. Per exemple, es considera que, en el conill, un defecte creat en el còndil femoral suporta més càrrega que un defecte creat en la fossa troclear. En el cas de l'ovella, el còndil femoral medial suporta més càrrega que el lateral.

La naturalesa de l'implant cel·lular, sigui autòleg o al·logènic s'ha de tenir en compte, ja que l'autòleg no hauria de presentar problemes, però l'al·logènic requerirà d'una immunosupressió de l'animal, més difícil d'aconseguir en uns models que en altres. S'ha de considerar també el seguiment i l'avaluació que es realitzarà a l'animal, ja que per exemple es disposa de tècniques

d'imatge com la ressonància magnètica nuclear (RMN) per a estudiar grans animals, però no de petits com els conills o els ratolins, ja que el cartílag és massa fi en aquest últims. A la taula 1.17 es resumeixen els principals avantatges i inconvenients que presenten els diferents models animals.

Taula 1.17. Resum dels avantatges i inconvenients dels models animals per a l'estudi de la regeneració de cartílag hialí (Ahern et al. 2009).

Espècie	Avantatges	Inconvenients
Murina	Costos de compra i manteniment molt baixos Disponibilitat de model immunodeprimits per a l'assaig de teràpies al·logèniques Disponibilitat de transgènics Possibilitat d'estabilització en laboratori	Cartílag massa fi per a l'aproximació quirúrgica Tècniques d'imatge molt cares.
Lapina	Costos de compra i manteniment baixos Possibilitat d'estabilització en laboratori Fonts disponibles controlades Experiència quirúrgica extensa	No presenta aproximació artroscòpica Cartílag relativament fi Reparació espontània massa fàcil No es poden utilitzar elements de fixació
Canina	Fonts disponibles controlades Àmpliament utilitzat en recerca en Osteoartritis (Model Pond-Nuki) Tolera rehabilitació amb fixadors externs	Costos de compra i manteniment alts Animal de companyia Problemes ètics Difícil d'obtenir animals esquelèticament madurs
Porcina	Costos de compra i manteniment assumibles Aproximació artroscòpica	Maduresa esquelètica massa ràpida Porcs de gran mida poden ser difícils de manipular
Ovina	Costos de compra i manteniment assumibles Aproximació artroscòpica Anatomia del genoll similar a l'humana Condicions de càrrega de l'articulació excel·lents.	Maduresa esquelètica tardana Malalties concomitants (Febre Q, Toxoplasmosis) Grassa patel·lar pot enmascarar l'articulació Grossor del cartílag molt variable Control post-operatori complicat
Caprina	Costos de compra i manteniment assumibles Aproximació artroscòpica Anatomia del genoll similar a l'humana Condicions de càrrega de l'articulació excel·lents.	Maduresa esquelètica tardana Anestèsia complicada Malalties concomitants (CAEV) Control post-operatori complicat
Equina	Anatomia del genoll similar a l'humana Condicions de càrrega de l'articulació excel·lents. Grossor del cartílag similar a l'humana Aproximació artroscòpica	Costos de compra i manteniment molt alts Animal de companyia Problemes ètics

1.6.1. Disseny experimental per a la regeneració de lesions osteocondrals

Actualment tots els tractaments quirúrgics per a la reparació de cartílag articular s'apliquen mitjançant una artrotomia, és a dir, una cirurgia oberta on l'articulació queda totalment exposada. La filosofia d'aquest treball es basa en l'assoliment d'unes bases per a una futura aplicació en humans, per tant, és clau la tècnica artroscòpica. Aquest fet determina un disseny de l'experiment, on la matriu es dissenya expressament per a poder ser implantada mitjançant el material d'artroscòpia del que es disposa. Aquesta és una de les innovacions que presenta aquest treball.

La tècnica d'artroscòpia es considera el sistema de referència en la diagnosi de les lesions de cartílag, i és d'elecció per a les intervencions quirúrgiques de genoll ja que redueix els temps de rehabilitació, el dolor i les possibles complicacions post-quirúrgiques com les infeccions (Oakley et al. 2005). En base a aquesta condició, es descarten el model murí i lapí donat que ambdós presenten el cartílag i l'articulació massa petits, fent impossible un abordatge artroscòpic, ni tan sols quirúrgic en el cas del ratolins. A més, són animals model molt petits utilitzats normalment per a estudis de cribatge, però en aquest treball es vol realitzar un desenvolupament de producte i es requereixen dades de toxicologia i farmacodinàmica en animals més similars a l'humà. El model porcí es descarta per presentar un creixement esquelètic tan ràpid que pot arribar a pesar uns 100 quilograms en 4 mesos, esdevenint un animal molt difícil de manipular i estabular. En el cas del model caní i equí es descarten per motius ètics i econòmics, són animals de companyia i no està acceptat socialment la seva utilització en la recerca. Un cop fetes aquestes consideracions, l'elecció es redueix entre l'espècie ovina i caprina.

Les diferències entre l'espècie ovina i caprina no es poden generalitzar a totes les subespècies del món. Depenent de la zona geogràfica en que es trobi, hi poden haver diferències significatives, per exemple, a la taula 1.16 s'observa com el gruix del cartílag de l'espècie caprina és més gran que l'ovina, encara que en el cas de la nostra regió geogràfica, la mida del còndil pot ser més gran en el cas oví que en el caprí (figura 1.27). Aquesta mida superior de l'ovella, fa que s'assembla més a la humana i, a més a més, permeti un millor abordatge artroscòpic i la seva manipulació intraoperatòria. Alguns autors asseguren que el genoll de l'ovella és el més similar al

de l'humà (Burger et al. 2007). És el model animal més utilitzat per a l'estudi de l'osteoartritis, una patologia molt relacionada amb les lesions osteocondrals (Little et al. 2010).



Figura 1.27. Còndils femorals exposats per a una ovella (esquerra) i una cabra (dreta). (Simon et al. 2009)

Per tant, tenint en compte tots els factors esmentats i les recomanacions dels cirurgians i veterinaris amb qui es col·labora, es decideix la selecció del model animal oví. L'ovella presenta una anatomia patel·lar molt similar a la humana i amb un genoll suficientment gran com per realitzar l'abordatge artroscòpic que es persegueix. Les ovelles són escollides d'entre un rang d'edat al voltant de 2-3 anys, coincidint amb la maduració esquelètica, i es comprova amb analítiques i plaques de raigs X, que el seu estat de salut és correcte i no presenten anomalies anatòmiques prèvies a l'experiment respectivament.

L'espècie ovina ha estat utilitzada per el desenvolupament del TACAM amb una avaluació artroscòpica de les lesions mitjançant un artroscòp confocal (Jones et al. 2008). Fins al moment no hi ha cap estudi publicat que contempli la incorporació de la tècnica artroscòpica a la implantació de matrius colonitzades per CMMA autòlogues expandides *in vitro* en model oví per al tractament de lesions osteocondrals. En el cas d'aquest treball, la finalitat no es diagnòstica sinó terapèutica, llavors es genera una lesió artificial model, i es posa a punt la metodologia quirúrgica per part dels cirurgians i veterinaris col·laboradors.

La lesió que es proposa ha de tenir una mida crítica i una forma similars a les que es troben normalment en les lesions condral. A la figura 1.28 es representen diferents tipus de lesions condral, on poden haver-hi des de lesions superficials (A) que només afecten al cartílag superficial, fins a les que afecten al cartílag (condral) produint una erosió més o menys profunda (B i C), o lesions osteocondral que afecten tant a la zona del cartílag com de l'os subcondral. En aquest treball s'intenta reparar o regenerar una lesió osteocondral com la que s'observa a la figura 1.28-D. Un cop establert el tipus de lesió, s'escull la morfologia cilíndrica, ja que així s'observa en la majoria dels casos de la literatura (Uematsu et al. 2005; Jiang et al. 2007; Nagura et al. 2007), és més adient per a l'aplicació artroscòpica, i és el model recomanat pels especialistes veterinaris i traumatòlegs, amb qui es col·labora en aquest treball.

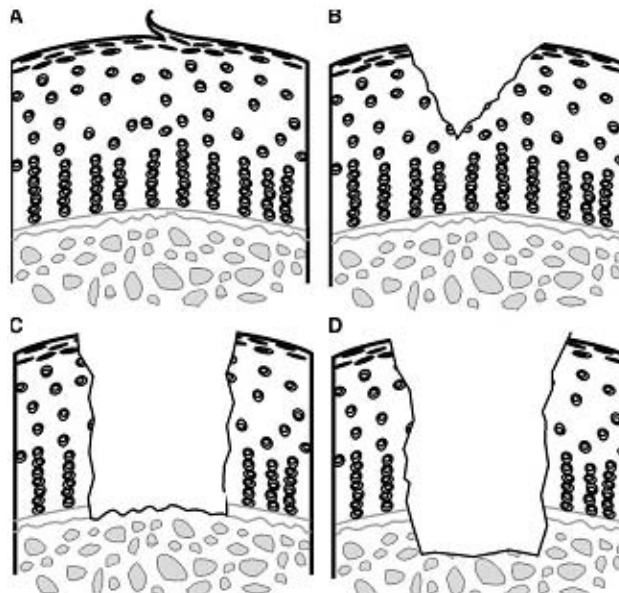


Figura 1.28. Representació de diferents tipus de lesions de cartílag hialí. A: Lesió superficial ; B: Lesió cartilaginosa que no arriba a la línia de marea ; C: Lesió condral completa ; D: Lesió osteocondral que arriba fins al moll d'os.

El material quirúrgic amb el que es porta a terme la implantació de les matrius (figura 1.29), són uns trocars de mosaicoplàstia amb una mida determinada per la mida de la lesió. No només la mida sinó la morfologia, en aquest cas els trocars són un cilindre buit, i les cànules receptora i donant també són cilíndriques d'acord amb la geometria seleccionada per la lesió. Tot el material quirúrgic està dissenyat per a la seva aplicació en humans, en canvi en aquest treball, s'ha adaptat el seu ús per a l'aplicació en ovella. A l'haver planificat ja la implantació artroscòpica

des d'un inici, tots els experiments que s'han portat a terme amb les matrius i la seva fabricació es dissenya per a aquesta geometria cilíndrica. Les característiques mecàniques de la matriu que s'utilitza han de permetre que aquesta sigui introduïda per la cànula de mosaicoplàstia i s'ajusti a la lesió experimental.



Figura 1.29. Conjunt de trocars utilitzats per a la implantació artroscòpica (Trefina de *Michele, Smith and Nephew Inc*, USA). La lesió es realitza amb un trocar que presenta les següents dimensions: 2,7 mm de diàmetre intern i 3,5 mm de diàmetre extern.

A la figura 1.30, s'il·lustra amb un esquema representatiu com es planteja la lesió osteocondral generada per artroscòpia. La lesió es realitza sobre la part central del còndil medial i genera un cilindre buit a l'os subcondral, amb pèrdua de cartílag articular, on es col·locarà el constructe.

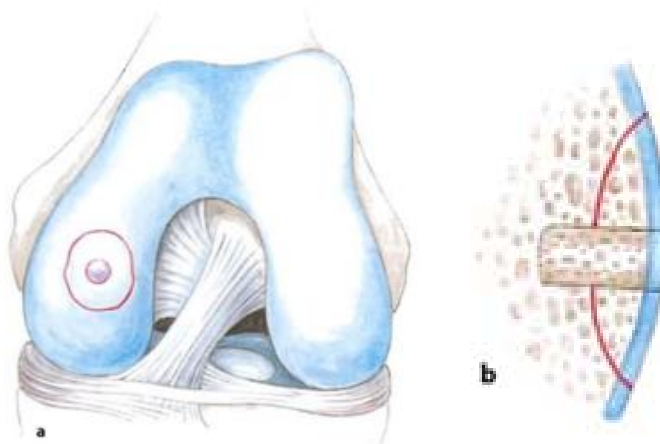


Figura 1.30. Il·lustració de la lesió experimental realitzada mitjançant artroscòpia en els còndils femorals. **a:** Vista superficial; **b:** Vista del còndil en tall sagital, on s'observa la lesió experimental que es genera. (Erggelet et al. 2008).

El procés queda definit a l'esquema de la figura 1.31, on s'extrau una mostra de cartílag articular de l'ovella. Posteriorment el teixit es disgrega i s'aïllen les CMMA, expandint-les fins a tenir les cèl·lules necessàries per a colonitzar un cilindre de PLGA en un sistema de colonització segur i estèril. Un cop el constructe cèl·lula-biomatriu està preparat, els cirurgians realitzen una lesió artificial sobre un còndil de l'articulació femoro-tibial i s'implanta el constructe en la lesió osteocondral mitjançant una artroscòpia. S'estableix un temps d'experimentació en base a les necessitats de la matriu per osteointegrarse. Posteriorment es sacrifiquen els animals per poder avaluar la regeneració de la lesió osteocondral amb el tractament proposat en aquest treball.

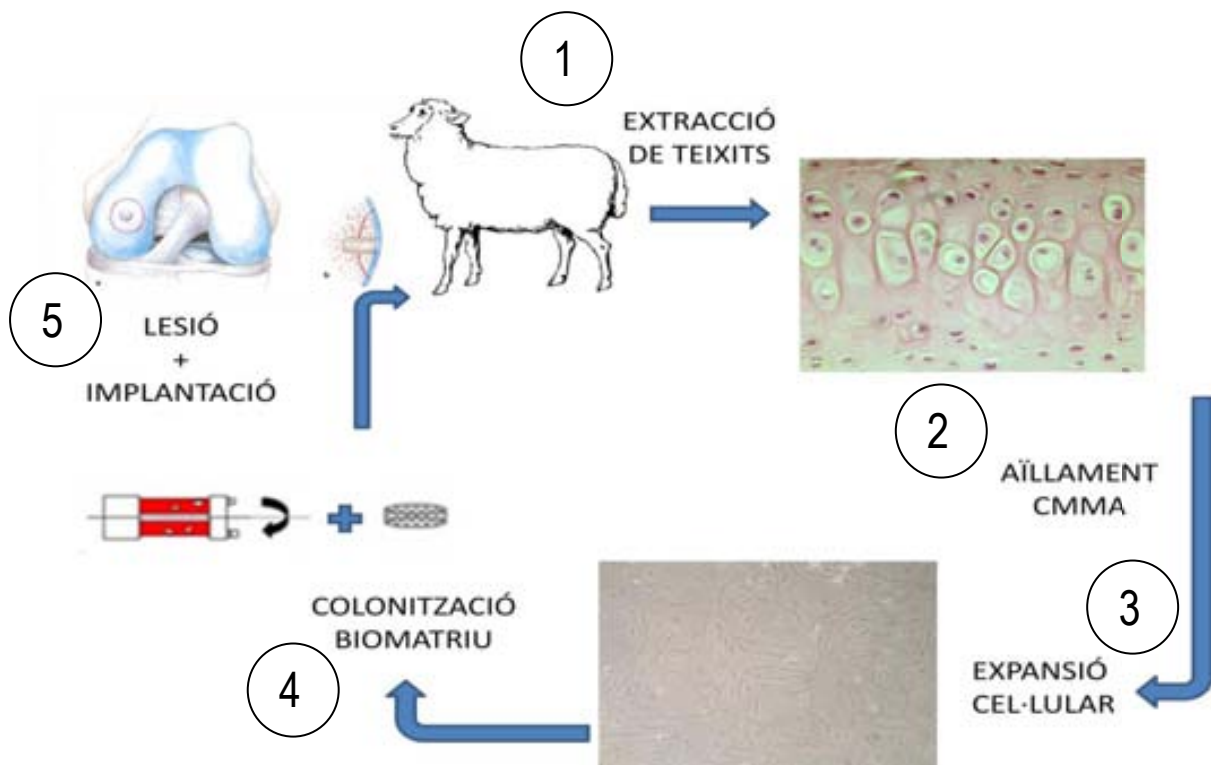


Figura 1.31. Esquema de l'experiment pilot que s'ha dissenyat per posar a punt les metodologies i els protocols per a la realització d'un futur assaig preclínic.

1.7. Bibliografia

- (2007). Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. L 324/121. T. E. P. a. t. C. o. t. E. Union. Official Journal of the European Union.
- Agrawal, C., et al. (2001). "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering." Journal of biomedical materials research **55**(2): 141-150.
- Ahern, B. J., et al. (2009). "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review." Osteoarthritis and Cartilage **17**(6): 705-713.
- Anderson, J. M., et al. (1997). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres." Advanced Drug Delivery Reviews **28**(1): 5-24.
- Archer, C. W., et al. (1994). "Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage." J Anat **184 (Pt 3)**: 447-56.
- Atala, A. (2008). Principles of regenerative medicine, Academic Press.
- Athanasiou, K., et al. (1998). "Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers." Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery **14**(7): 726-737.
- Athanasiou, K., et al. (2009). Articular Cartilage Tissue Engineering, Morgan & Claypool Publishers.
- Athanasiou, K., et al. (1997). "Biodegradable implants for the treatment of osteochondral defects in a goat model." Tissue Engineering **3**(4): 363-373.
- Athanasiou, K. A., et al. (1995). "Applications of biodegradable lactides and glycolides in podiatry." Clin Podiatr Med Surg **12**(3): 475-95.
- Bach, R., et al. (2007). Articular Cartilage: Structure, Biology, and function. Cartilage repair strategies. R. Williams, L. Peterson and B. Cole, Humana Press.
- Barnes, D., et al. (1980). "Methods for growth of cultured cells in serum free medium." Analytical Biochemistry **102**: 255-270.
- Bellemans, J. (1999). "Osseointegration in porous coated knee arthroplasty. The influence of component coating type in sheep." Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum **288**: 1.
- Bentley, G., et al. (1984). "Current concepts of etiology and treatment of chondromalacia patellae." Clin Orthop Relat Res(189): 209-28.
- Bernardo, M. E., et al. (2007). "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms." Cancer research **67**(19): 9142.
- Brehm, W., et al. (2006). "Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results." Osteoarthritis and Cartilage **14**(12): 1214-1226.
- Breinan, H. A., et al. (1997). "Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model." The Journal of Bone and Joint Surgery **79**(10): 1439.
- Brittberg, M., et al. (1994). "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." N Engl J Med **331**(14): 889-95.
- Brittberg, M., et al. (1996). "Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes." Clinical orthopaedics and related research **326**: 270.
- Brocklehurst, R., et al. (1984). "The composition of normal and osteoarthritic articular cartilage from human knee joints. With special reference to unicompartmental replacement and osteotomy of the knee." J Bone Joint Surg Am **66**(1): 95-106.
- Buckwalter, J. A., et al. (1993). "Soft-tissue aging and musculoskeletal function." J Bone Joint Surg Am **75**(10): 1533-48.
- Bullough PG, Jagannath A. The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. J Bone Joint Surg Br 1983; 65B: 72-78

- Burger, C., et al. (2007). "The sheep as a knee osteoarthritis model: early cartilage changes after meniscus injury and repair." Laboratory animals **41**(4): 420.
- Caplan, A. (2003). "Embryonic development and the principles of tissue engineering." Tissue engineering of cartilage and bone: 17.
- Caplan, A. (2005). "Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics." Tissue Engineering **11**(7-8): 1198-1211.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Casteilla, L., et al. "Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update."
- Centeno, C. J., et al. (2008). "Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells." Pain Physician **11**(3): 343-53.
- Centeno, C. J., et al. (2011). "The Use of Mesenchymal Stem Cells in Orthopedics: Review of the Literature, Current Research, and Regulatory Landscape." Journal of American Physicians and Surgeons **16**(2): 38.
- Centeno, C. J., et al. (2010). "Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique." Current Stem Cell Research & Therapy **5**(1): 81-93.
- Clar, C., et al. (2005). "Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation." Health Technol Assess **9**(47): iii-iv, ix-x, 1-82.
- Clark JM, Norman AG, Kääh MJ, Nötzli HP. The surface contour of articular cartilage in an intact, loaded joint. J Anat 1999; 195: 45-56
- Cruess, R. L. (1971). "Cartilage repair." J Bone Joint Surg Br **53**(3): 365.
- Chen, C. T., et al. (1999). "Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent." J Orthop Res **17**(6): 870-9.
- Chen, G., et al. (2003). "The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67**(4): 1170-1180.
- Chu, C. R., et al. (2010). "Animal models for cartilage regeneration and repair." Tissue Eng Part B Rev **16**(1): 105-15.
- Daniels, A., et al. (1990). "Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone." Journal of Applied Biomaterials **1**(1): 57-78.
- de la Fuente, R., et al. (2004). "Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells." Experimental cell research **297**(2): 313-328.
- De Ugarte, D., et al. (2003). "Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow." Immunology letters **89**(2-3): 267-270.
- Deng, Y., et al. (2002). "Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds." Biomaterials **23**(20): 4049-4056.
- Diligence, M., Ed. (2002). Trends & Opportunities in Arthroscopy & Soft Tissue Repair Markets, 2002-2012.
- Dominici, M., et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Dudas, J., et al. (2006). "The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects." Annals of plastic surgery **56**(5): 543.
- Dunkelman, N. S., et al. (1995). "Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system." Biotechnology and bioengineering **46**(4): 299-305.

- Eid, K., et al. (2001). "Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA polymer disks in a rat tibial wound." Journal of biomedical materials research **57**(2): 224-231.
- Emin, N., et al. (2008). "Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: Effects of TGF- 1 and microgravity bioreactor culture." Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology **36**(2): 123-137.
- Erggelet, C., et al. (2008). Principles of Cartilage Repair, Steinkopff.
- FDA (1999). Guidance for the Preparation of a Premarket Notification Application for a Surgical Mesh. D. o. H. a. H. Services. Washington, DC:.
- Freed, L., et al. (1994). "Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds." Journal of biomedical materials research **28**(8): 891-899.
- Freed, L. E., et al. (1997). "Tissue engineering of cartilage in space." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(25): 13885.
- Freed, L. E., et al. (1994). "Kinetics of chondrocyte growth in cell polymer implants." Biotechnology and bioengineering **43**(7): 597-604.
- Freed, L. E., et al. (1997). "Microgravity tissue engineering." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal **33**(5): 381-385.
- Freed, L. E., et al. (1998). "Culture of organized cell communities." Advanced Drug Delivery Reviews **33**(1-2): 15-30.
- Freyman, T. M., et al. (2001). "Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering." Progress in materials science **46**(3-4): 273-282.
- Friedenstein, A., et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-90.
- Fujisato, T., et al. (1996). "Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold." Biomaterials **17**(2): 155-162.
- Fukuda, K., et al. (1995). "Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2." Inflammation Research **44**(4): 178-181.
- Furukawa, T., et al. (1980). "Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee." J Bone Joint Surg Am **62**(1): 79-89.
- Gee, A. (2009). Cell Therapy: CGMP Facilities and Manufacturing, Springer Verlag.
- Geron. (2009). "Geron receives FDA clearance to begin world's first human clinical trial of embryonic stem cell-based therapy " Retrieved 10-10-11, 2011, from <http://www.geron.com/media/pressview.aspx?id=1148>.
- Geron. (2011a). "Geron Presents Clinical Data Update from GRNOPC1 Spinal Cord Injury Trial." Retrieved 23-10, 2011, from <http://www.geron.com/media/pressview.aspx?id=1279>.
- Geron. (2011b). "Geron to Focus on its Novel Cancer Programs." Retrieved 20-11, 2011, from <http://www.geron.com/media/pressview.aspx?id=1284>.
- Gimble, J., et al. (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." Cytotherapy **5**(5): 362-369.
- Glassy, M., et al. (1988). "Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production." Biotechnology and Bioengineering **32**: 1015-1028.
- Goldberg, V., et al. (2004). Principles of Tissue Engineering and Regeneration of Skeletal Tissues. Orthopedic tissue engineering: basic science and practices, Marcel Dekker.
- Goldring SR, Goldring MB. Biology of the normal joint. En: Firestein GS, Budd RC, Harris ED Jr., McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS. Kelley's - Textbook of Rheumatology (8ª edición). Ed. Elsevier. 2008. Págs. 1-22.
- Gooch, K. J., et al. (2001). "IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development." Biochemical and biophysical research communications **286**(5): 909-915.
- Grande, D. A., et al. (1997). "Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts." J Biomed Mater Res **34**(2): 211-20.

- Guo, X., et al. (2004). "Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep." Tissue Engineering **10**(11-12): 1830-1840.
- Guo, X., et al. (2004). "Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into -tricalcium phosphate in a sheep model." Tissue Engineering **10**(11-12): 1818-1829.
- Hamerman, D., et al. (1970). "Diarthrodial joints revisited." The Journal of bone and joint surgery. American volume **52**(4): 725.
- Hembry, R. M., et al. (2001). "Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report." J Bone Joint Surg Am **83-A**(6): 826-38.
- Hentze, H., et al. (2007). "Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts." Trends in Biotechnology **25**(1): 24-32.
- Herrmann, J. B., et al. (1970). "Polyglycolic acid sutures. Laboratory and clinical evaluation of a new absorbable suture material." Archives of Surgery **100**(4): 486-490.
- Holland, S. J., et al. (1986). "Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems." Journal of Controlled Release **4**(3): 155-180.
- Hollister, S. (2001). "Cartilage Structure and fuction". Instructional courses on Biomedical Engineering. U. o. Michigan.
- Hollister, S. J. (2009). "Scaffold engineering: a bridge to where?" Biofabrication **1**: 012001.
- Homminga, G. N., et al. (1991). "Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondrial graft." Acta Orthop Scand **62**(5): 415-8.
- Honda, M., et al. (2004). "Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: Hybrid 75: 25 poly (L-lactide-[epsilon]-caprolactone) sponge." Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **62**(12): 1510-1516.
- Horwitz, E., et al. (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **7**: 393-5.
- Horwitz, E., et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." Blood **97**(5): 1227.
- Huang, J., et al. (2002). "Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells." Plastic and reconstructive surgery **109**(3): 1033.
- HUANG, J., et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Engineering **7**(2).
- Hung, S., et al. (2007). "Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis." Stem cells **25**(9): 2363-2370.
- Hunter, W. (1743). "On the structure and diseases of articular cartilage." Philos Trans R Soc Lond **42**: 514-21.
- Hunziker, E. B., et al. (1998). "Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells." J Bone Joint Surg Br **80**(1): 144-50.
- Insight, M., Ed. (2003). U.S. Markets for sports medicine devices and productcts.
- Ishaug-Riley, S., et al. (1999). "Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films." Biomaterials **20**(23-24): 2245-2256.
- Jackson, D. W., et al. (2001). "Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S14-25.
- Jain, R. A. (2000). "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices." Biomaterials **21**(23): 2475-2490.
- Jeffrey, M. "Phases I&# 8211; III Clinical Trials Using Adult Stem Cells." Stem Cells International **2010**.
- Jiang, C. C., et al. (2007). "Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite." Journal of Orthopaedic Research **25**(10): 1277-1290.

- Johnson, P. C., et al. (2007). "Strategic directions in tissue engineering." Tissue Engineering **13**(12): 2827-2837.
- Jones, C. W., et al. (2008). "Matrix induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy." Journal of Orthopaedic Research **26**(3): 292-303.
- Jubel, A., et al. (2008). "Transplantation of de novo scaffold-free cartilage implants into sheep knee chondral defects." The American Journal of Sports Medicine **36**(8): 1555.
- Kretlow, J. D., et al. (2010). "Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects." Tissue Engineering Part A **16**(12): 3555-3568.
- Kuznetsov, S., et al. (1997). "Single Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo." Journal of bone and mineral research **12**(9): 1335-1347.
- Lanza, R., et al. (2007). Principles of tissue engineering, Academic Press.
- Lawrence, R., et al. (2008). "Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part II." Arthritis & Rheumatism **58**(1): 26-35.
- Lazarus, H. M., et al. (1995). "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use." Bone marrow transplantation **16**(4): 557-564.
- Le Blanc, K., et al. (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." The Lancet **363**(9419): 1439-1441.
- Lee, C. R., et al. (2000). "Articular cartilage chondrocytes in type I and type II collagen-GAG matrices exhibit contractile behavior in vitro." Tissue Engineering **6**(5): 555-565.
- Lee, M. H., et al. (2009). "Considerations for tissue-engineered and regenerative medicine product development prior to clinical trials in the United States." Tissue Engineering Part B: Reviews **16**(1): 41-54.
- Lee, M. H., et al. (2010). "Considerations for tissue-engineered and regenerative medicine product development prior to clinical trials in the United States." Tissue Eng Part B Rev **16**(1): 41-54.
- Lee, R., et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(46): 17438.
- Lee, S. C., et al. (1994). "Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP 2 in PLGA matrix." Journal of biomedical materials research **28**(10): 1149-1156.
- Little, C. B., et al. (1996). "Topographic variation in biglycan and decorin synthesis by articular cartilage in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in sheep." J Orthop Res **14**(3): 433-44.
- Little, C. B., et al. (2010). "The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats." Osteoarthritis and Cartilage **18**: S80-S92.
- Litzke, L. F., et al. (2004). "Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation." Annals of Biomedical Engineering **32**(1): 57-69.
- Lysaght, M. J., et al. (2008). "Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics." Tissue Engineering Part A **14**(2): 305-315.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2001). "Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study." Osteoarthritis and Cartilage **9**: S6-S15.
- Mandl, E. W., et al. (2004). "Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity." Tissue Eng **10**(1-2): 109-18.

- Manfredini, M., et al. (2007). "Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique." Acta Orthopædica Belgica **73**(2): 207.
- Mankin HJ, et al. (1997). Forma y Función del Cartílago Articular. Ciencias Básicas en Ortopedia. S. R. and Simon. Barcelona, Medical Trens SL.
- Mankin, H. J., et al. (1975). "Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage." J Bone Joint Surg Am **57**(1): 76-80.
- Masini, B. D., et al. (2009). "Resource utilization and disability outcome assessment of combat casualties from Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom." J Orthop Trauma **23**(4): 261-6.
- Mason, C., et al. (2010). "Regenerative medicine cell therapies: numbers of units manufactured and patients treated between 1988 and 2010." Regen. Med **5**(3): 307–313.
- Matyas, J. R., et al. (1995). "Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis." Arthritis Rheum **38**(3): 420-5.
- Maurer (1986). Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. Oxford, IRL Press.
- Mauritz, C., et al. (2008). "Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells." Circulation **118**(5): 507.
- McAlinden, A., et al. (2001). "Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **9**(1): 33-41.
- Meachim, G. (1980). "Ways of cartilage breakdown in human and experimental osteoarthrosis." The Aetiopathogenesis of Osteoarthrosis: 16–28.
- Medtech Insight, L. (2002). "US markets for current and emerging orthopedic biomaterials products and technologies." Report nr Report: 320.
- Melero-Martin, J., et al. (2007). "In vitro expansion of chondrocytes." Topics in tissue engineering **3**: 1–37.
- Mesimäki, K., et al. (2009). "Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells." International journal of oral and maxillofacial surgery **38**(3): 201-209.
- Middleton, J., et al. (2000). "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices." Biomaterials **21**(23): 2335-2346.
- Milgram JW. Capítol 3: The Structure of Adult Joints. En: Milgram JW. Radiologic and Histologic Pathology of Nontumorous Diseases of Bones and Joints. Northbrook (Illinois): Northbrook Publishing Company, Inc. 1990; pg. 29-32 (a)
- Murphy, J., et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." Arthritis & Rheumatism **48**(12): 3464-3474.
- Murphy, J. M., et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." Arthritis & Rheumatism **48**(12): 3464-3474.
- Murray, R. C., et al. (1999). "Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage." J Orthop Res **17**(5): 725-31.
- Musina, R., et al. (2005). "Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues." Bulletin of experimental biology and medicine **139**(4): 504-509.
- Nagura, I., et al. (2007). "Repair of osteochondral defects with a new porous synthetic polymer scaffold." The Journal of bone and joint surgery. British volume **89**(2): 258.
- Nehrer, S., et al. (1998). "Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model." Biomaterials **19**(24): 2313-2328.
- Oakley, S. P., et al. (2005). "Arthroscopy—a potential "gold standard" for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis." Osteoarthritis and Cartilage **13**(5): 368-378.
- Ortiz, L., et al. (2007). "Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(26): 11002.

- Ossendorf, C., et al. (2007). "Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: two year clinical results." Arthritis Research and Therapy **9**(2): 41.
- Panyam, J., et al. (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." Advanced Drug Delivery Reviews **55**(3): 329-347.
- Papoutsakis, E. (1991). "Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage." Trends in Biotechnology **9**: 316-324.
- Park, G. E., et al. (2005). "Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds." Biomaterials **26**(16): 3075-3082.
- Perry, D. (2000). "Patients' voices: the powerful sound in the stem cell debate." Science **287**(5457): 1423.
- Phinney, D., et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views." Stem cells **25**(11): 2896-2902.
- PhRMA (2006). "Survey: New medicines in development. Biotechnology." Pharmaceutical research and Manufacturers of America.
<http://www.phrma.org/files/Biotech%202006.pdf>.
- Pittenger, M., et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143.
- Pittenger, M. F., et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. J Anat 1997; 191:1-13
- Puelacher, W. C., et al. (1994). "Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices." International journal of oral and maxillofacial surgery **23**(1): 49-53.
- Puelacher, W. C., et al. (1994). "Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices." Int J Oral Maxillofac Surg **23**(1): 49-53.
- Reinholz, G. G., et al. (2004). "Animal models for cartilage reconstruction." Biomaterials **25**(9): 1511-1521.
- Ross, M., et al. (2006). Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rubio, D., et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer research **65**(8): 3035.
- Russlies, M., et al. (2005). "Periosteum stimulates subchondral bone densification in autologous chondrocyte transplantation in a sheep model." Cell and tissue research **319**(1): 133-142.
- Sarro, E. (2010). Sistemes de monitoratge per a cultius de cèl·lules animals adherents. Desenvolupament i aplicacions en models cel·lulars i tissulars., UAB.
- Sato, T., et al. (2001). "Tissue-engineered cartilage by in vivo culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge." Materials Science and Engineering: C **17**(1-2): 83-89.
- Scott, J. E. (1996). "Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen." Biochemistry **35**(27): 8795-9.
- Schäffler, A., et al. (2007). "Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell Based Therapies." Stem cells **25**(4): 818-827.
- Shacter, E. (1989). "Serum-free media for bulk culture of hybridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies." Trends in Biotechnology **7**: 248-253.
- Simon, T. M., et al. (2009). "Cartilage Regeneration and Repair Testing in a Surrogate Large Animal Model." Tissue Engineering Part B: Reviews **16**(1): 65-79.
- Sittinger, M., et al. (1994). "Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture." Biomaterials **15**(6): 451-456.

- Solchaga, L., et al. (1992). "Efecto de la desalineación axial sobre el cartilago articular. Modelo experimental en corderos." MAPFRE Medicina **3**: 79-85.
- Song, L., et al. (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." The FASEB Journal: 03.
- Stockwell, R. (1967). "The cell density of human articular and costal cartilage." Journal of Anatomy **101**(Pt 4): 753.
- Suggs, L., et al. (1999). "In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels." Journal of Biomedical Materials Research Part A **46**(1): 22-32.
- Tallheden, T., et al. (2003). "Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 93.
- Tatebe, M., et al. (2005). "Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit." Cytotherapy **7**(6): 520-30.
- Thomson, R. C., et al. (1996). "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **7**(1): 23-38.
- Toma, J., et al. (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." Nature Cell Biology **3**(9): 778-784.
- Toolan, B. C., et al. (1998). "Development of a novel osteochondral graft for cartilage repair." J Biomed Mater Res **41**(2): 244-50.
- TuftsCenter (2001). <http://csdd.tufts.edu/NewsEvents/RecentNews.asp?newsid=6>.
- Tuli, R., et al. (2004). "Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct." Tissue Engineering **10**(7-8): 1169-1179.
- Uematsu, K., et al. (2005). "Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold." Biomaterials **26**(20): 4273-4279.
- Upmeier, H., et al. (2007). "Follow-up costs up to 5 years after conventional treatments in patients with cartilage lesions of the knee." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **15**(3): 249-57.
- Vacanti, C. A., et al. (1994). "Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures." The American Journal of Sports Medicine **22**(4): 485.
- Vacanti, J., et al. (1993). "Tissue engineering." Science **260**: 6.
- Vunjak Novakovic, G., et al. (1999). "Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage." Journal of Orthopaedic Research **17**(1): 130-138.
- Vunjak Novakovic, G. (2003). "The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors." Tissue engineering of cartilage and bone: 34-51.
- Wagner, W., et al. (2007). "Mesenchymal stem cell preparations—comparing apples and oranges." Stem Cell Reviews and Reports **3**(4): 239-248.
- Wang, Y., et al. (2006). "Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes." Biomaterials **27**(25): 4434-4442.
- Wen, X., et al. (2006). "Fabrication and characterization of permeable degradable poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels." Biomaterials **27**(20): 3800-3809.
- Williams, C. J., et al. (1995). "Heritable diseases of cartilage caused by mutations in collagen genes." J Rheumatol Suppl **43**: 28-33.
- Williams, R., et al. (2007). Cartilage repair strategies, Humana Press.
- Wood, J., et al. (2006). "Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration." The Journal of Bone and Joint Surgery **88**(3): 503.
- Woodfield, T. B., et al. (2002). "Scaffolds for tissue engineering of cartilage." Critical reviews in eukaryotic gene expression **12**(3): 209-236.
- Wu, Y., et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem cells **25**(10): 2648-2659.

- Young, H., et al. (1995). "Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs." American Journal of Anatomy **202**(2): 137-144.
- Young, H., et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." The Anatomical Record **264**(1): 51-62.
- Zimmermann, J., et al. (2002). "Novel hydrogels as supports for in vitro cell growth: poly (ethylene glycol)-and gelatine-based (meth) acrylamido-peptide macromonomers." Biomaterials **23**(10): 2127-2134.

CAPÍTOL 2

OBJECTIUS

2.1. Objectius del treball.

L'objectiu principal que es pretén assolir en aquest treball és el desenvolupament d'una teràpia de medicina regenerativa per al tractament de lesions osteocondrals. Es planteja una aproximació experimental basat en la generació d'una lesió osteocondral artificialitzada en un animal model, i la seva reparació o regeneració mitjançant la utilització de cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) i una biomatriu. S'estudiaran diferents característiques (forma i composició del polímer) de la biomatriu, i diferents combinacions CMMA-biomatriu, i les preparacions o constructes amb millors característiques es provaran en animal d'experimentació, per avaluar la seva seguretat i eficàcia. A continuació es llisten algunes de les recomanacions, establertes per l'Agència Europea del Medicament (EMA), per a l'estudi de la toxicitat, la seguretat i l'eficàcia del nou medicament (EMA 2007):

- Revelació del mecanisme d'acció del producte, ja sigui mitjançant el sacrifici dels animals per subgrups o per mètodes no letals com les tècniques d'imatge o l'artroscòpia.

- Duració del experiment suficientment extensa per poder observar i demostrar la integració i la eficàcia del producte.

- Estudis de biodistribució, migració i residència de les cèl·lules en el teixit diana. Les cèl·lules poden migrar i produir disfuncions cardiovasculars, renals i d'altres en funció del teixit on vagin a parar. Estudis de seguretat farmacològica són necessaris a nivell local i sistèmic.

- Examinació i avaluació histològica del lloc d'implantació i les zones col·lindants mitjançant un processament histopatològic de les mostres després de la necròpsia. Examinació i avaluació dels limfonodes i dels òrgans susceptibles de metàstasi.

- Si un cop implantades, les cèl·lules es diferencien cap a un llinatge determinat i la seva expressió proteica canvia, llavors s'han de realitzar estudis de toxicitat que analitzin el patró d'excreció de les cèl·lules. S'ha d'estudiar la interacció del producte amb els components tant cel·lulars com estructurals del nou nínxol.

- Els estudis de toxicitat han d'abordar tant el producte com els diversos components utilitzats durant la seva fabricació i manufactura. El risc d'inducció de tumorigenicitat del propi producte o per part de restes del procés de fabricació, requereix descartar-ho amb estudis de tumorigenicitat. A més, s'ha de demostrar que aquest no generi cap reacció adversa ni immunogènica.

Tenint en compte aquestes recomanacions de l'EMA, l'elaboració d'aquest treball es divideix en tres parts ben diferenciades: a la primera part s'estudien diferents tipus cel·lulars de CMMA provinents de tres orígens mesenquimals diferents. A la segona part, un cop establert el disseny de l'assaig preclínic, es desenvolupa una biomatriu i s'estudia la seva colonització per part de les CMMA. La tercera part es pot dividir en dues etapes, una primera etapa on es posen a punt totes les tècniques i procediments per portar a terme l'experiment preclínic emprant un tipus concret de cèl·lules i una segona etapa on es realitza l'assaig preclínic complet amb les tres fonts cel·lulars i amb un nombre d'animals superior al de la primera etapa. Cal ressaltar que el disseny de l'experiment es fa en funció de les característiques del cartílag articular, influint sobre la combinació o constructe biomatriu-CMMA que es desenvolupa i caracteritza per poder realitzar un assaig preclínic i provar l'eficàcia i la seguretat del tractament en el model animal experimental escollit. El pla de treball que es planteja dins de cadascuna d'aquestes parts i els seus objectius específics associats són els següents:

1) Component cel·lular.

- Aïllar i estudiar l'expansió cel·lular de les tres fonts que es plantegen en aquest treball per a la producció de CMMA del model animal escollit.
- Estudiar cinèticament i fisiològicament la proliferació cel·lular de les CMMA i determinar les condicions de cultiu òptimes per a l'expansió cel·lular.
- Demostrar que les CMMA derivades de teixits mesenquimàtics diferenciats mostren característiques mesenquimals com la multipotencialitat i l'expressió de determinats marcadors de superfície.
- Estudiar l'efecte del suplement del sèrum en la proliferació cel·lulars de les CMMA, tant humanes com animals, i seleccionar el millor per a l'expansió cel·lular.

2) Desenvolupament del constructe CMMA-biomatriu.

- Disseny de l'assaig preclínic que definirà les característiques del constructe CMMA-biomatriu.
- Fabricació de la biomatriu en funció de les característiques de la lesió i el procés de preparació escollit.
- Estudi de la colonització per CMMA de la matriu més adient i selecció per obtenir una distribució cel·lular homogènia.

3) Assaig preclínic per a la regeneració de lesions osteocondrals.

- Integrar tots els punts previs per a la fabricació del constructe a utilitzar en la investigació de la regeneració de lesions osteocondrals en un determinat model animal.
- Realitzar l'assaig preclínic amb el model animal escollit.
- Avaluat els resultats de l'assaig preclínic amb diferents metodologies d'imatge, des de macroscòpiques fins a histològiques, analitzant si la teràpia desenvolupada és segura i eficaç per a la regeneració de lesions osteocondrals.

2.2. Bibliografia.

EMA (2007). Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products. EMA/CHMP/410869/2006. E. M. Agency. London: 18-20.

CAPÍTOL 3

CARACTERITZACIÓ DE CÈL·LULES MESENQUIMALS

Tal i com ja s'ha comentat a la introducció, les cèl·lules són un dels components clau en medicina regenerativa, essent les cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) les escollides per a la regeneració de cartílag hialí en aquest treball de tesi. Per tant, és necessària una exhaustiva caracterització, a nivell tant cel·lular com molecular. Així doncs, seguidament es descriuran les estratègies per a l'aïllament de CMMA de les diferents fonts cel·lulars plantejades, moll d'os (MO), cartílag i teixit adipós. S'ha realitzat un seguiment dels principals aspectes del cultiu de cèl·lules animals adherents, és a dir, processos de caracterització del creixement cel·lular sobre plàstic, de caracterització fisiològica, de caracterització de la diferenciació i de caracterització molecular. Cadascun d'aquests seguiments s'estudien per separat mitjançant les tècniques descrites al capítol 7.

Per poder demostrar que les CMMA aplicades a la medicina regenerativa són útils, és important la validació dels resultats *in vitro* en un model animal. Per tant, s'ha escollit un model animal per a realitzar experiments de recerca bàsica i preclínica, la ovella. Paral·lelament a l'estudi de les CMMA humanes, s'han caracteritzat les diferents fonts de CMMA del model oví. Alguns dels aspectes estudiats han estat la fisiologia, el creixement, l'aïllament, el fenotip, l'expressió gènica i la multipotencialitat.

3.1. Aïllament i expansió de CMMA ovines.

A l'hora de dur a terme qualsevol teràpia basada en medicina regenerativa per a la creació d'un teixit de característiques morfològiques i mecàniques adequades, es requereix un elevat nombre de cèl·lules per a poder-la iniciar, número que dependrà de l'àrea o volum de teixit a regenerar. Per posar un exemple, a la teràpia cel·lular per al tractament de la malaltia de l'empelt contra l'hoste, està bastant establerta una dosi que oscil·la entre $1-2E+06$ cèl·lules/kg per a cada pacient (Giordano et al. 2007), encara que tal i com s'ha comentat a la introducció, l'aplicació amb matriu que es vol desenvolupar en aquest treball reduirà probablement aquestes necessitats, així en el capítol 4, un cop definit la mida de lesió experimental i les matrius amb les que es treballarà, es determinaran les dosis cel·lulars pertinents. Tot i així, per tal d'aconseguir aquesta quantitat de cèl·lules per a iniciar una teràpia, serà necessari realitzar i posar a punt l'aïllament i l'expansió de la font cel·lular escollida.

Existeix poca experiència en l'aïllament de CMMA dels diferents teixits en els que es treballarà en el model animal oví. En canvi, existeixen diferents mètodes per a les diferents fonts en l'espècie humana, generalment basats en digestions enzimàtiques o centrifugacions per gradient de densitat (de ficoll o percoll). A continuació s'exposaran els resultats obtinguts de l'adaptació i de les millores introduïdes als diferents processos d'aïllament de cadascuna de les fonts cel·lulars a estudiar.

El fet de no tenir marcadors específics fa que les CMMA siguin unes cèl·lules complicades d'aïllar amb una puresa suficient per establir un cultiu primari que proporcioni rendiments elevats en l'expansió per a usos clínics. Durant els últims anys s'han desenvolupat diversos mètodes d'aïllament. A la figura 3.1. es representen les dues estratègies més àmpliament utilitzades. Les CMMA derivades de moll d'os poden ser aïllades mitjançant una sembra directa del moll d'os (MO) (figura 3.1.A) o mitjançant una estratègia de dues etapes, una en la que es realitza una centrifugació amb un gradient de ficoll o percoll (figura 3.1.B), i una segona en la que es sembra les CMN en placa i es manté en cultiu durant un temps determinat. La metodologia exacta s'ha realitzat en condicions molt diverses (Rentsch et al. 2010; McCarty et al. 2009), de forma que és aconsellable establir el protocol de treball en cada cas.

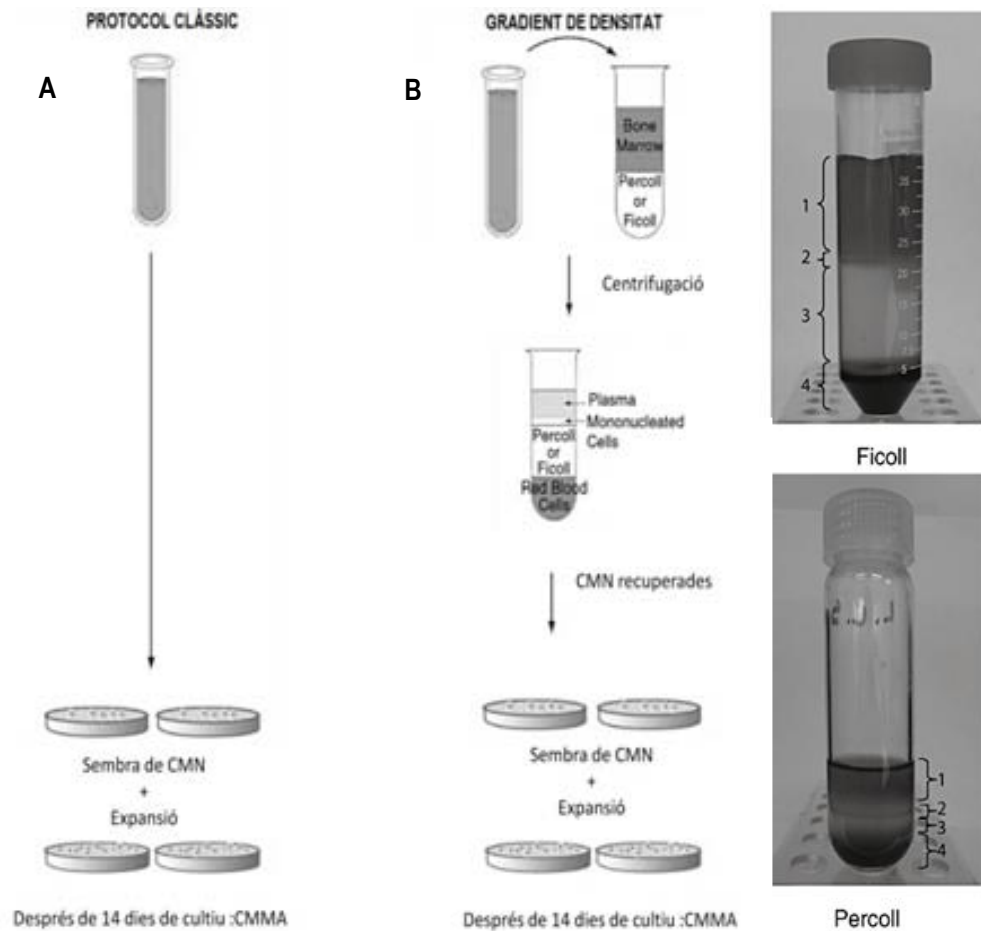


Figura 3.1. Protocols per aïllar CMMA a partir de moll d'os. **A:** Sembrada directa del moll d'os. **B:** Sembrada de la fracció de CMN; A la dreta es mostren els dos tipus de gradient de densitat que més s'utilitzen, Ficoll i Percoll. Els números corresponen a les diferents bandes cel·lulars que s'observa a la separació per centrifugació : 1- Plasma 2- CMN; 3- Ficoll/Percoll; 4- Sang. Adaptat de (Bourzac et al. 2010).

3.1.1. Protocol d'aïllament de CMN i CMMA ovines.

En aquest treball, s'ha plantejat un protocol d'aïllament mitjançant dues etapes en les que, en primer lloc, es realitza una centrifugació mitjançant un gradient de ficoll (Histopaque®, Sigma) i, en segon lloc, una expansió de les cèl·lules adherents presents a la fracció que correspon a les CMN, que s'obtenen mitjançant la separació per centrifugació. El cultiu de les CMN i l'aïllament de les CMMA depèn d'una sèrie de factors que influiran a la cinètica i les característiques de les cèl·lules, tals com són el sèrum utilitzat per complementar el medi, el medi de cultiu i el moment de rentat de les CMN.

Els protocols per a l'aïllament de CMN a partir de moll d'os humà no es poden aplicar directament per obtenir CMN de moll de l'os d'altres espècies, però són similars. Per determinar les condicions per a la realització de l'aïllament de CMN ovines, es tenen en compte les condicions més habitualment emprades per aïllar CMN humanes, i s'ajusten les següents variables: velocitat de centrifugació (*g*), temps de centrifugació, densitat del ficoll, dilució PBS:sang de moll d'os i la relació de ficoll-MO (taula 3.1).



Figura 3.2. A l'esquerra (A) extracció de moll d'os de l'estern d'ovella sota condicions d'esterilitat. L'extracció es realitzava en quiròfans equipats per a experimentació animal per personal qualificat, utilitzant material d'un sol ús per preservar l'esterilitat màxima. A la dreta (B) moll d'os extret. El cirurgià dipositava el moll d'os extret en tubs falcon de 50mL que contenien anticoagulant (ACD-A Grifols®)

L'extracció de moll d'os és realitzada per cirurgians traumatòlegs i veterinaris, amb una dilatada experiència en experimentació animal que han col·laborat en el projecte de recerca en que s'emmarca el present treball. El protocol i disseny experimental va ser revisat i aprovat (número 688) pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Sota anestèsia, els animals són intervinguts, i mitjançant una sèrie de punxades a l'estern (figura 3.2) s'extreu el màxim volum possible de moll d'os. Després d'una sèrie d'experiments d'extracció de diferents localitzacions entre les quals es troben la cresta ilíaca, l'húmer i l'estern, es va decidir realitzar l'extracció de l'estern per motius de volum d'extracció de moll d'os. Un cop determinat el lloc d'extracció, el MO es recull en un tub de centrifuga estèril i es realitza una separació per gradient mitjançant ficoll, un polisacàrid d'un elevat pes molecular, que aglutina els glòbuls vermells i fa augmentar la seva velocitat de sedimentació. Tots els elements de la sang presenten una densitat diferent, per tant poden ser separats mitjançant un gradient de densitat. En aquest cas, la fracció hemàtica queda al fons en la fase vermella, els leucòcits i limfòcits queden a la part superior en la fase sèrica, i els monòcits, que és la fracció on hi ha les CMN, queden en la fase clara intermèdia entre la hemàtica i la sèrica.

Taula 3.1. Resum dels resultats del cribatge per a les condicions del gradient de Ficoll per l'aïllament de cèl·lules mononucleades del moll d'os.

Densitat Histopaque (g/mL)	Centrifugació (g)	Dilució sang:PBS		Relació Ficoll:MO		CMN/mL MO	Aspecte
				Ficoll(mL)	MO(mL)		
1.077	200	1	1	3	3	2.73E+05	Interfase difusa
1.077	200	1	1	4.5	10.5	1.12E+05	Sense interfase
1.077	200	1	3	3	3	3.80E+05	Sense interfase
1.083	200	1	1	3	3	3.12E+05	Interfase difusa
1.083	200	1	3	3	3	5.00E+04	Interfase difusa
1.191	200	1	1	3	3	3.57E+05	Sense interfase
1.191	200	1	1	4.5	10.5	1.50E+05	Sense interfase
1.191	200	1	3	3	3	1.65E+05	Sense interfase
1.077	330	1	1	4.5	10.5	2.00E+04	Sense interfase
1.083	330	1	1	3	3	3.97E+05	Interfase dèbil
1.083	330	1	3	3	3	5.95E+05	Interfase difusa
1.191	330	1	1	3	3	6.00E+04	Interfase dèbil
1.191	330	1	1	4.5	10.5	8.52E-01	Sense interfase
1.191	330	1	3	3	3	5.00E+04	Sense interfase
1.077	670	1	1	4	4	2.05E+05	Banda dèbil
1.077	330	1	1	20	20	1.38E+06	Sense interfase
1.077	330	1	1	15	35	7.14E+06	Sense interfase
1.083	330	1	1	15	35	6.75E+05	Sense interfase
1.083	330	1	1	20	20	9.14E+05	Sense interfase
1.077	670	1	1	20	20	2.33E+06	Banda blanca fina
1.077	670	1	1	15	35	2.29E+06	Banda blanca clara
1.083	670	1	1	15	35	2.64E+06	Banda blanca clara
1.077	1000	1	1	5	5	3.84E+06	Banda cel·lular evident

A la taula 3.1. es presenten els resultats amb les variables estudiades: la velocitat de centrifugació (g), la relació de ficoll-MO i la dilució de sang:PBS. En les centrifugacions a velocitats baixes, en el cas de la variable densitat del ficoll, no s'observa cap milloria respecte de les solucions d'alta densitat (1.083g/mL i 1.191g/mL) comparat amb el que correspon amb la densitat sanguínia (1.077g/ml). La separació cel·lular, a més, no millora macroscòpicament. No es produeix una separació per fases del component cel·lular vermell (eritròcits), complicant molt el processament posterior i fent impossible un recompte cel·lular de les CMN al microscopi invertit de contrast de fase. Aquest fet fa que s'introdueixi un pas de lisi d'eritròcits amb 160 mM NH_4Cl per millorar la visualització de les CMN al microscopi. Pel que fa al rendiment de CMN obtingudes per mil·lilitre de moll d'os, tampoc millora, sent lleugerament menor en el cas de la densitat alta. Els rendiments en centrifugacions de baixa velocitat son d'un ordre de magnitud de $1+E04$ - $1+E05$, en quant a CMN/MO (nombre de CMN per mL de moll d'os obtingut), en canvi quan s'augmenta la velocitat a 670g, l'ordre de magnitud augmenta fins a $1+E06$.

Un dels aspectes que s'ha valorat de manera prioritària ha estat l'aspecte del ficoll, en concret l'aparició de la banda on la fase que correspon a les CMN es separa de la resta. En el primer cas, 200g, ni tan sols s'observa una interfase evident. En els altres dos casos, 300g i 670g s'observa una interfase dèbil o, fins i tot, en els millors casos, una banda blanca clara. A la taula 3.1 es pot observar que les bandes més clares i diferenciades són les que corresponen a uns rendiments d'obtenció de CMN/MO més alts.

En els casos en que no existeix interfase o aquesta és molt dèbil, s'extreuen les cèl·lules de la posició on haurien d'aparèixer, entre el plasma i la sang, obtenint un rendiment molt baix de CMN. Per tant la variable de la velocitat de centrifugació (g) és la més sensible per tal d'ajustar les condicions de l'aïllament de les CMN del MO.

El protocol amb el que s'aconsegueix obtenir una separació completa i distingible per a l'extracció és la centrifugació a 1000g, figura 3.3, on s'observa clarament la banda marcada amb una fletxa negra. Aquesta és la banda que, mitjançant un procés manual, s'utilitza per continuar amb el protocol d'aïllament de CMMA provinents de moll d'os.

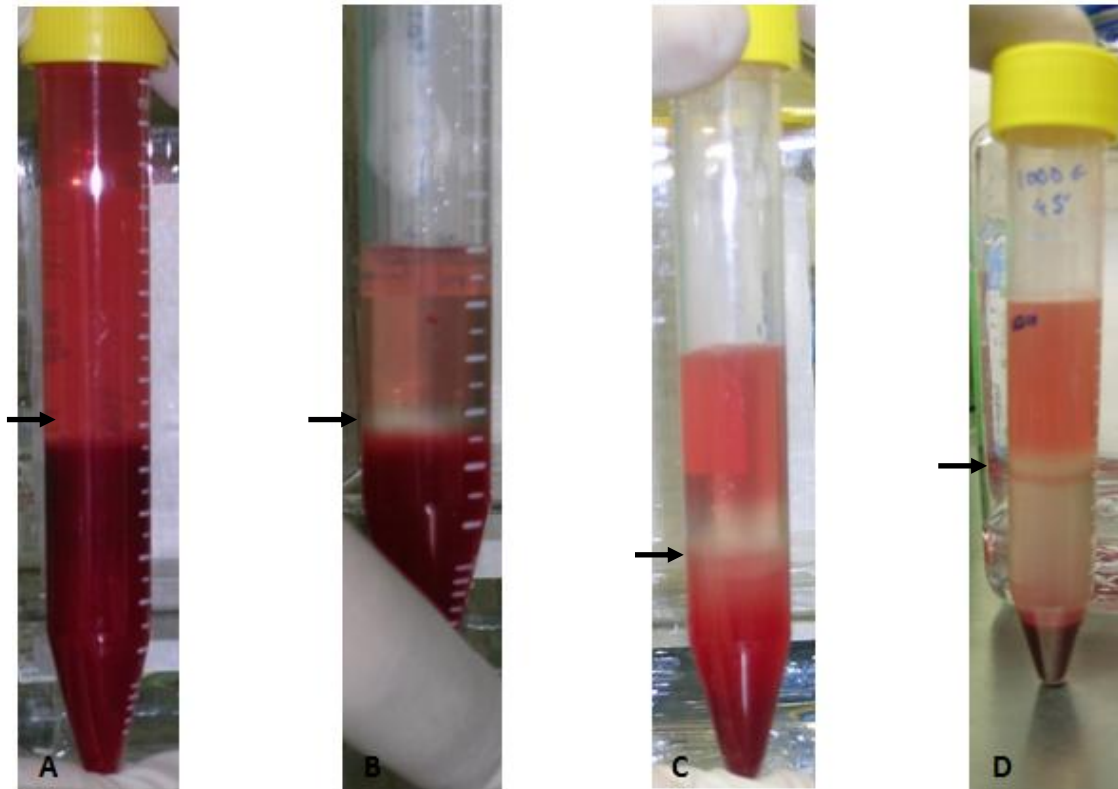


Figura 3.3. Diferents condicions d'aïllament (en quant a la velocitat de centrifugació (g)) de les CMN. A: 200g en la que no s'observa cap interfase; B: 300g en que s'observa una interfase dèbil; C: 670g en la que s'observa una interfase difusa; D: 1000g en la que s'observa una banda cel·lular evident.

Un cop determinades les condicions que permeten observar macroscòpicament la banda cel·lular on queden les CMN i on el resultat de rendiment d'obtenció de CMN per mil·lilitres de MO ($3.84E+06$) és més elevat, s'estandarditza el protocol tal i com s'exposa a l'apartat 7.1.1.1. de Materials i Mètodes, consistent en una dilució del MO 1:1 amb PBS i la centrifugació en tubs de centrífuga de 15mL amb una relació 1:1 (MO-PBS:Ficoll) amb Ficoll (Histopaque) de densitat 1,077 g/mL, a una velocitat de centrifugació de 1000g.

Les CMN aïllades del gradient de ficoll es sembren en un flascó de cultiu per poder aïllar les CMMA, utilitzant la seva propietat d'adherència a suports plàstics. La figura 3.4, mostra l'aspecte típic dels cultius durant el procés d'aïllament i expansió. Als primers dies de cultiu, l'observació microscòpica mostra una població cel·lular amb molta heterogeneïtat a nivell morfològic, així com una elevada mortalitat, deguda a que la fase aïllada del ficoll està formada per la fracció de CMN i les CMMA, però només aquestes últimes tenen la capacitat d'adherir-se al

plàstic del flascó de cultiu, de manera que aquesta població s'enriqueix després del rentat amb PBS, de les cèl·lules presents en el sobrenedant (figura 3.4-B).

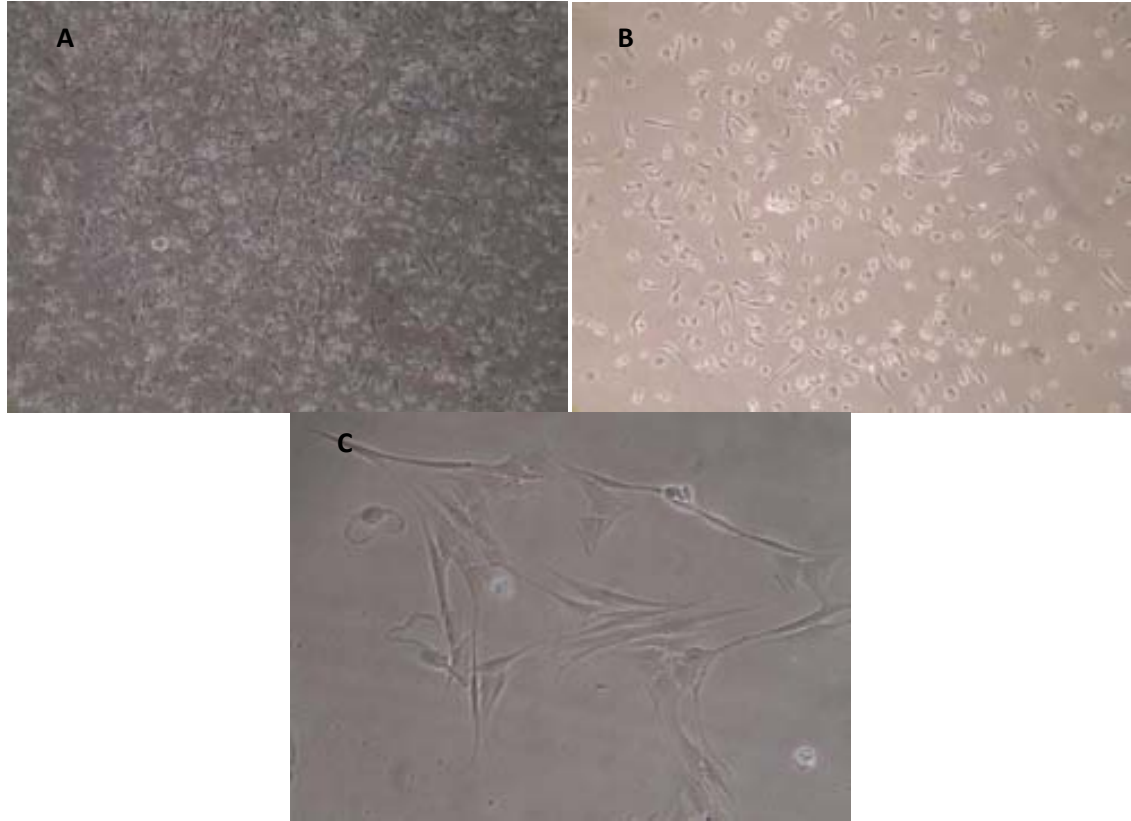


Figura 3.4. Procés d'aïllament de les CMMA per rentat de les CMN. A) Població inicial de cèl·lules obtingudes després de la separació per gradient de densitats. B) Població una vegada eliminades les CMN per rentat. C) Morfologia típica de les CMMA en fase d'expansió.

La capacitat d'adherència de les CMMA és la que permet i facilita l'expansió d'una població cel·lular amb una morfologia més homogènia, caracteritzada per un cos petit, del qual es prolonguen unes extensions llargues, amb un nucli gran i rodó, fàcil d'identificar al microscopi (figura 3.4-C). La morfologia correspon al que a la literatura s'anomena "*fibroblastic-like*", ja que s'assembla a la de cèl·lules fibroblàstiques. Els cultius durant les primeres hores no presenten adherència i les cèl·lules presenten una morfologia esfèrica (figura 3.4-A). El procés d'adherència requereix un determinat temps. El temps de rentat no està establert, hi ha diferents alternatives operacionals com rentar amb PBS els cultius a les 24 hores (Colter et al. 2000), 72 hores (Campagnoli et al. 2001) o 120 hores (Murphy et al. 2003). No hi ha estudis que comparin les densitats de sembra de les CMN i el temps de rentat, en canvi si s'han desenvolupat altres formes

d'optimitzar els protocols d'aïllament i expansió de CMMA mitjançant altres procediments, com la complementació dels medis de cultius amb llisats de plaquetes o modificant les condicions de cultiu (pO_2) (Carrancio et al. 2008). En aquest treball no s'han implementat aquestes optimitzacions, però si s'ha estudiat, en el següent apartat, la relació entre el temps de rentat i el creixement de les CMMA.

Pel que fa a l'aïllament de CMMA a partir del cartílag hialí s'ha posat a punt un mètode de digestió enzimàtica, descrit a l'apartat 7.1.1.2. Breument, es tracten les biòpsies de teixit cartilaginós obtingudes per cirurgians traumatòlegs, d'un còndil d'un genoll reemplaçat per una pròtesi, mitjançant una digestió enzimàtica (figura 3.5-A) on l'enzim principal és la col·lagenasa tipus II, que degrada la matriu extracel·lular i allibera condrocits que es desdiferencien cap a CMMA i s'adhereixen al plàstic de forma semblant a la que s'observa en les CMMA provinents de moll d'os.

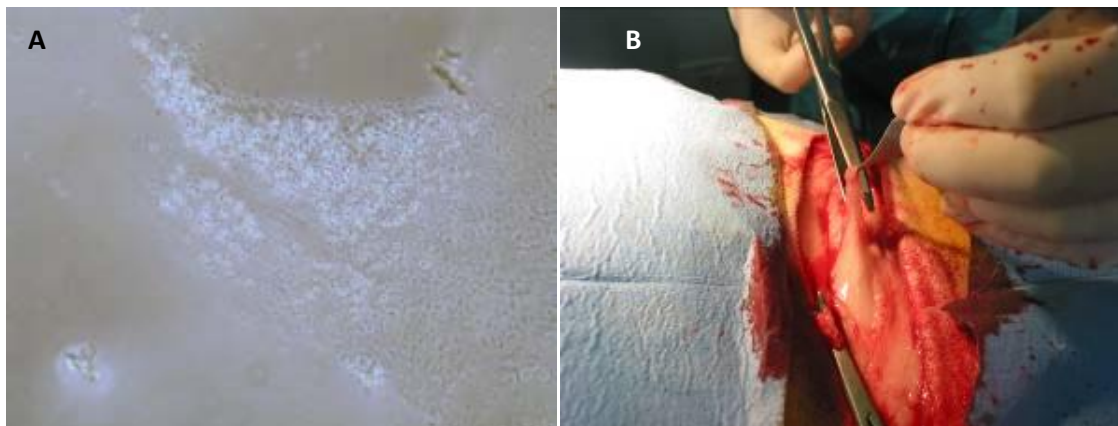


Figura 3.5. Aïllament de CMMA a partir de cartílag i greix. A: Cartílag durant el procés de disgregació enzimàtica; B: Extracció mitjançant biòpsia intraoperatòria de greix subcutani.

En el cas de CMMA derivades de greix oví, s'ha adaptat un mètode basat en els protocols existents en model humà (Gimble et al. 2003; Niemeyer et al. 2007) i caní (Neupane et al. 2008). El protocol està descrit a l'apartat 7.1.1.3. Breument, es tracten les biòpsies de greix obtingudes per cirurgians veterinaris, mitjançant una disgregació mecànica, seguida d'una digestió enzimàtica amb col·lagenasa tipus I. Aquest protocol degrada la matriu extracel·lular i allibera adipòcits que es desdiferencien cap a CMMA i s'adhereixen al plàstic de forma semblant a la que s'observa en les CMMA provinents de moll d'os i cartílag. La gran diferència amb els protocols humans, on s'obté el greix per lipoaspiració, va ser que no es disposava de la tecnologia de lipoaspirat. Per aquest

motiu es va haver de fer una prospecció a diferents localitzacions anatòmiques de l'ovella per determinar el lloc idoni d'extracció del greix mitjançant biòpsia intraoperatòria (figura 3.5-B). Els elements que s'han de tenir en compte són la quantitat de grassa que es pot extreure, la comorbiditat de la biòpsia i la quantitat de cèl·lules que s'obtenen. Tal i com es detalla a l'apartat 7.1.1.3, es treuen fragments de teixit adipós dels flancs, la zona de prop de la cresta ilíaca. Aquesta localització pot estar relacionada amb la correlació que es troba entre la quantitat de CMMA de greix i la presència de vasos sanguinis (Caplan et al. 2008).

3.1.2. Caracterització de la cinètica de creixement de CMMA provinents de moll d'os.

El procés d'expansió és una etapa molt important a l'hora de definir qualsevol aproximació en medicina regenerativa, donat que un dels factors clau per al seu desenvolupament és la densitat de cèl·lules al implant, o les cèl·lules tota d'un tractament. L'aspecte clau en la caracterització d'aquest procés d'expansió és la determinació de les cinètiques de creixement. Com s'ha comentat anteriorment, donada la característica de creixement per adhesió d'aquestes cèl·lules, la determinació de la cinètica de creixement s'ha d'efectuar mitjançant cultius en paral·lel, en plaques de cultiu de sis pous, de forma que per a cada mesura de concentració cel·lular (cada 48 hores) cal sacrificar dos dels pous, per tal de desadherir les cèl·lules i procedir al seu recompte.

Aquest procés vindrà influenciat per dues variables fonamentals: la densitat de sembra de CMN i el temps al que s'efectua el rentat de les CMN del sobrenedant (temps de rentat). Per tal de valorar el seu efecte, s'ha procedit al seguiment de la concentració cel·lular fora de línia de diversos cultius cel·lulars als que se'ls ha anat variant aquestes dues condicions. Les concentracions inicials utilitzades són de $1E+05$, $2E+05$, $4E+05$ i $6E+05$ CMN/cm². Els cultius es realitzen en plaques de 6 pous en condicions estàndards de cultiu i s'efectuen recomptes de concentració cel·lular per duplicat cada 48 hores aproximadament. Pel que fa al temps de rentat de les CMN del sobrenedant, s'ha emprat 3 (R3) o 5 (R5) dies post-sembrada de les CMN.

Donada la dificultat de fer un seguiment en línia de la concentració cel·lular en aquests sistemes de cultiu, i la òbvia limitació del seguiment fora de línia, associada a la necessitat de

destruir la placa de cultiu on es fa la mesura, cal valorar la utilització de mesures indirectes del creixement cel·lular (Sarró, 2010). Dintre d'aquestes alternatives es poden trobar en base a l'anàlisi de l'activitat cel·lular, on una de les més utilitzades, es basa en l'evolució de la mesura o bé dels substrats presents en el medi de cultiu o bé de subproductes del metabolisme cel·lular.

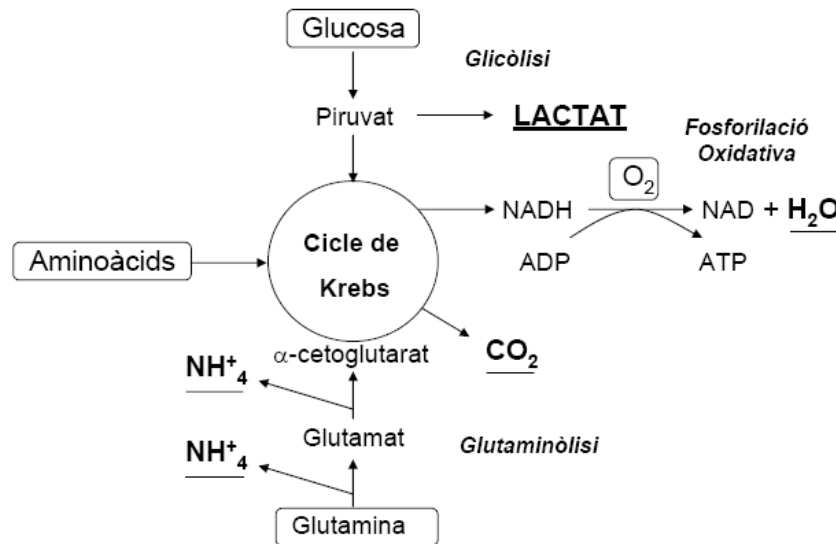


Figura 3.6 Esquema simplificat del metabolisme central en una la cèl·lula animal.

De l'esquema simplificat de les rutes del metabolisme central de les cèl·lules animals, representat a la figura 3.6, es pot observar que els substrats bàsics necessaris pel cultiu de cèl·lules animals són l'oxigen, la glucosa i els aminoàcids, essent la glutamina el més important entre els aminoàcids. Per altra banda, els subproductes principals del metabolisme cel·lular animal són, el lactat com a producte final de la glicòlisi i de la glutaminòlisi, el diòxid de carboni com a subproducte del cicle de Krebs i l'amoni, que es produeix durant la desamidació de la glutamina i desaminació del glutamat, per tal de donar glutamat i en la subseqüent formació de l' α -cetoglutarat.

El seguiment de l'activitat cel·lular s'ha basat en la mesura d'alguns dels metabòlits anomenats anteriorment. Dels substrats i subproductes que es poden mesurar, els més utilitzats pel seguiment de cultius de cèl·lules animals són la glucosa i el lactat (Campmajó et al. 1994), que es poden mesurar a partir d'anàlisis enzimàtics mitjançant un YSI 2700 Select (apartat 7.5.2.). A continuació, a la figura 3.7 es mostren els perfils de creixement per a les diferents densitats de sembra de CMN, als 3 dies de temps de rentat.

Aplicació de cèl·lules mare mesenquimals per a la regeneració de cartilag hialí

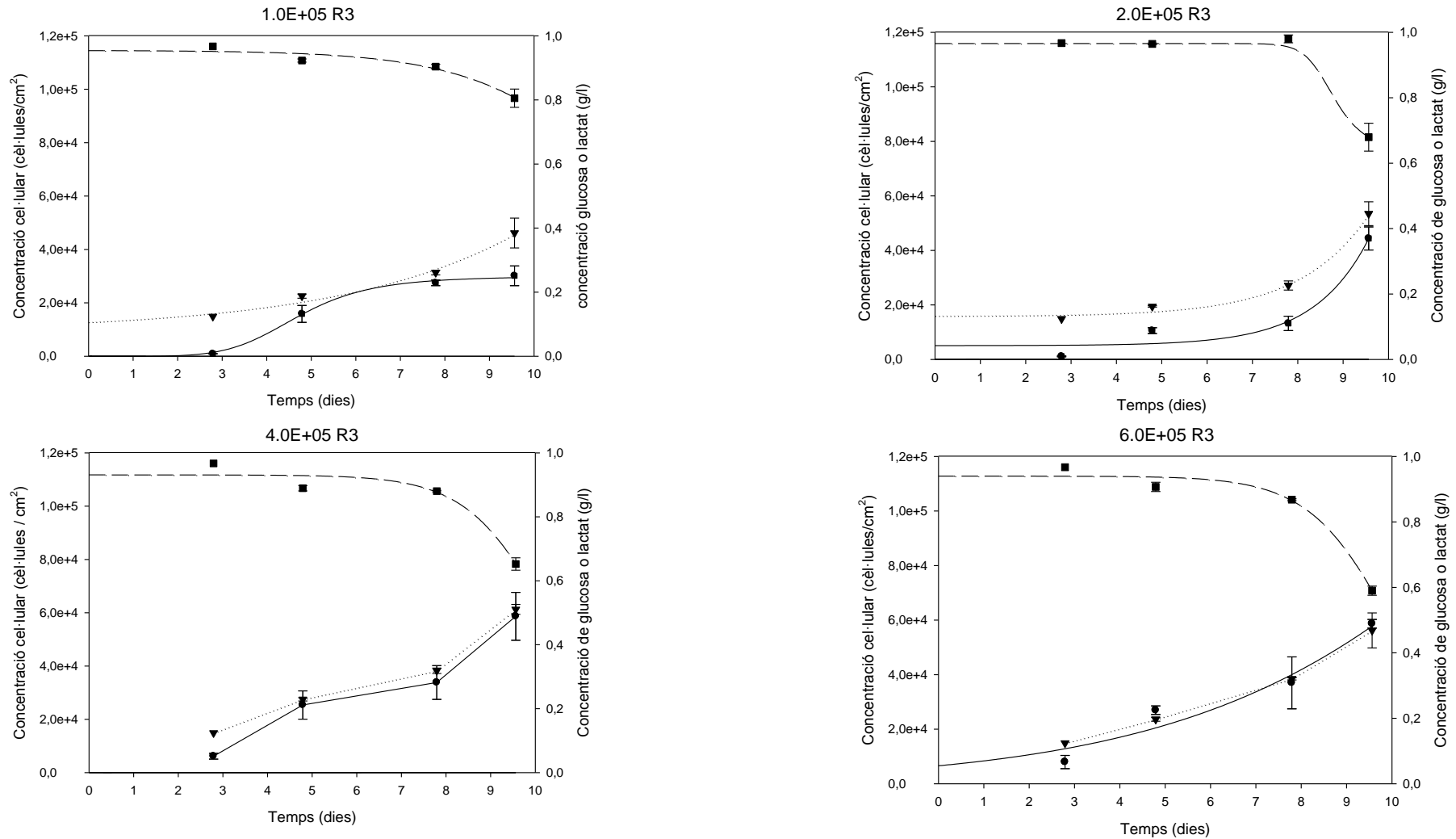


Figura 3.7. Perfils de creixement de CMMA derivades de moll d'os d'ovella. Sembrada de CMN a diferents densitats ($1E+05, 2E+05, 4E+05, 6E+05$ CMN/cm²) i rentat a dia 3 (R3) post-sembrat. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

Dels resultats obtinguts, s'observa en els perfils de concentració cel·lular que la fase de latència present en els diferents creixements és superior per aquells cultius amb menor concentració cel·lular inicial. A les dues densitats de sembra inferiors, els temps de latència oscil·len entre els 5 i 8 dies, en canvi, a les densitats de sembra altes el temps de latència està entre 3 i 5 dies. Els cultius amb una densitat de sembra superior $4E+05$ CMN/cm² i $6E+05$ CMN/cm², arriben a unes concentracions màximes de $5,8E+04$ i $5,9E+04$ cèl·lules/cm² respectivament. Un altre fet que visualment es pot observar són els consums de glucosa, on no s'observa cap activitat metabòlica fins al moment del primer rentat amb PBS. Un cop es renten les CMN i comencen a créixer les CMMA, comença també el consum de glucosa.

A la figura 3.8 es pot observar que les cèl·lules expandides amb densitat de sembra més altes, s'obtenen aproximadament el doble de cèl·lules finals respecte a l'inòcul més baix, i al dia 10 de cultiu ja mostren grups de cèl·lules més condensats, amb pocs espais buits per al creixement cel·lular, per tant assolint la confluència del cultiu. En aquest moment es presenta l'efecte d'inhibició per contacte. Aquest efecte s'observa millor en la figura 3.10.

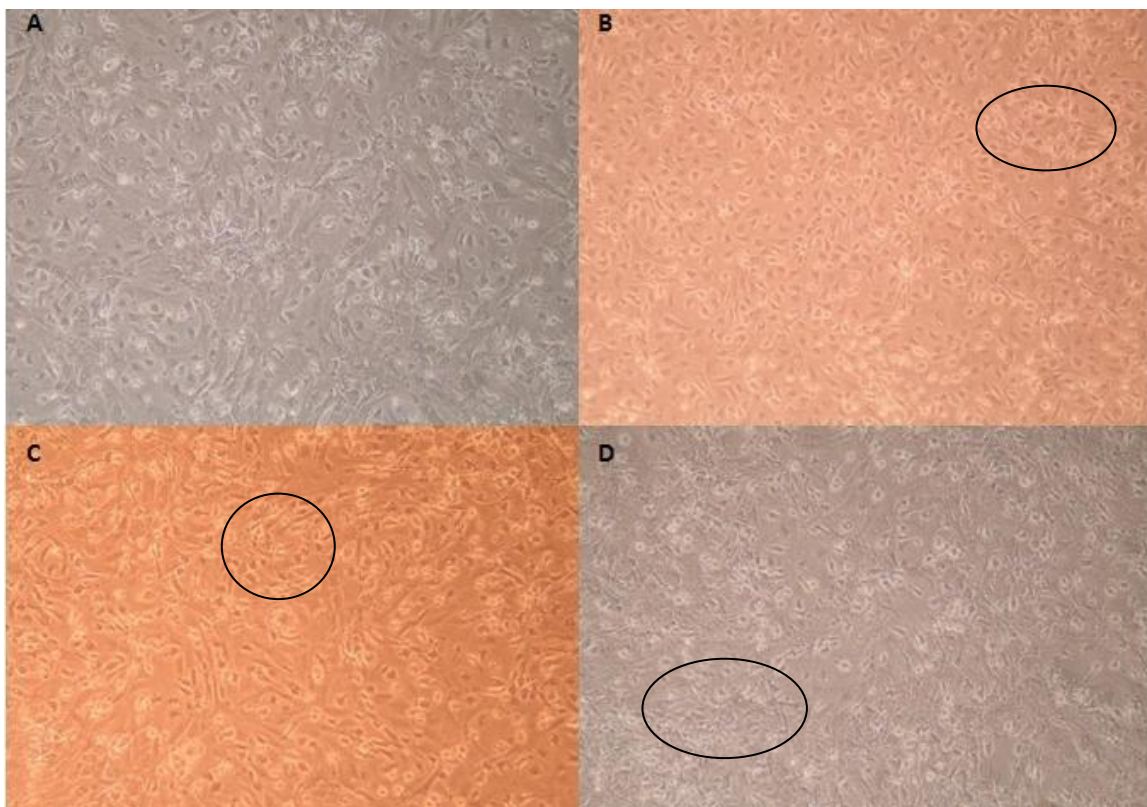


Figura 3.8. Cultius de CMMA expandides fins al dia 10 de cultiu, després de rentar les CMN 3 dies després de la sembra. Es poden observar les diferents densitats de confluència que s'obtenen amb les diferents densitats de sembra $1E+05$ CMN/cm² (A), $2E+05$ CMN/cm² (B), $4E+05$ CMN/cm² (C) i $6E+05$ CMN/cm² (D). Encerclat en negre s'observen zones on el creixement ha arribat a la confluència.

Aplicació de cèl·lules mare mesenquimals per a la regeneració de cartilag hialí

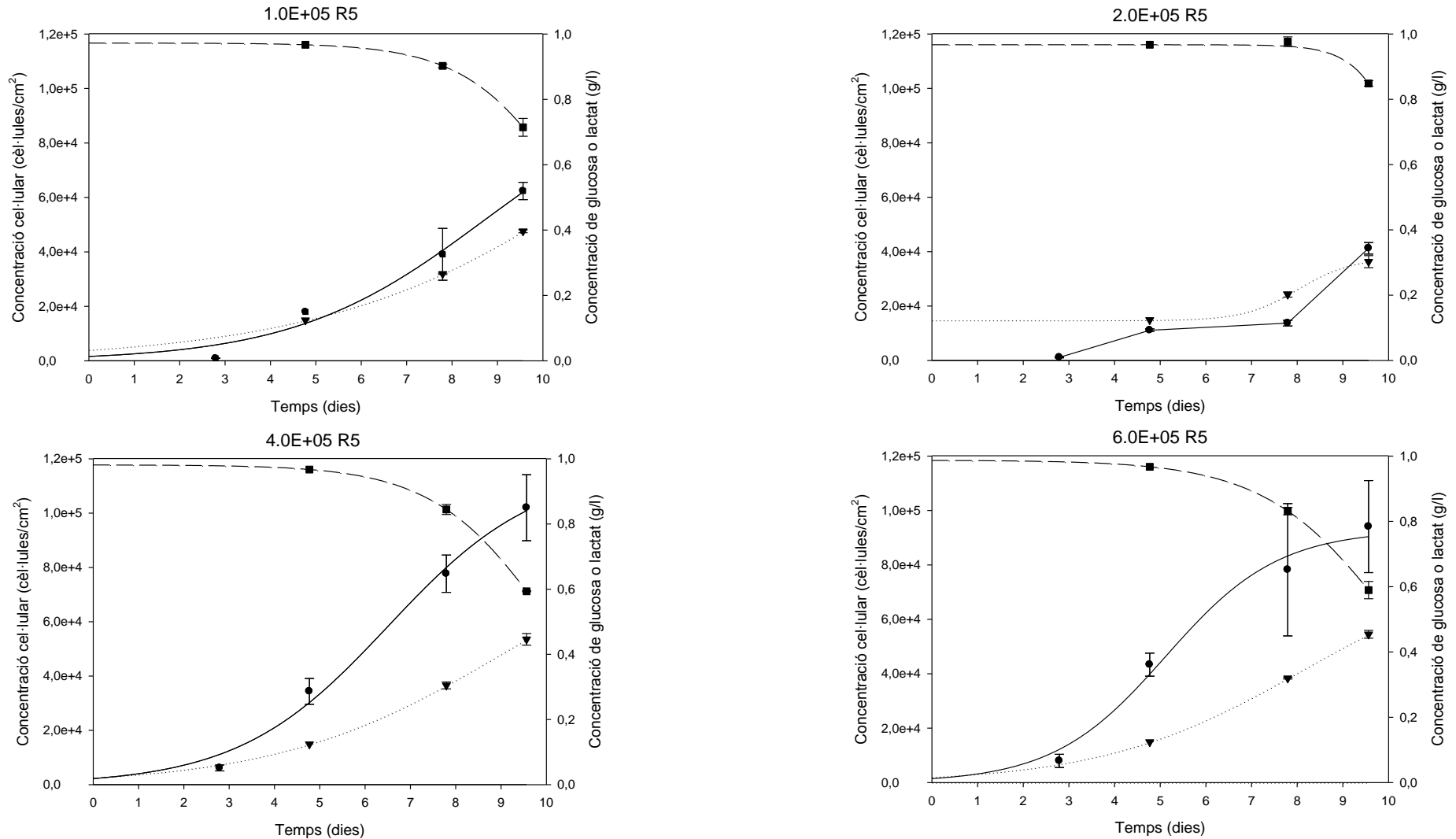


Figura 3.9. Perfils de creixement de CMMA derivades de moll d'os d'ovella. Sembrada de CMN a diferents densitats (1E+05,2E+05,4E+05,6E+05 CMN/cm²) i rentat a dia 5 (R5) post-sembra. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

A la figura 3.9 es mostren els perfils de creixement per a les diferents densitats de sembra de CMN als 5 dies de temps de rentat. En el cas del rentat als 5 dies (figura 3.10), el primer punt experimental correspon amb el primer valor de concentració cel·lulars dels cultius que es van rentar el dia 3 (R3), ja que se suposa la mateixa concentració cel·lular i les mateixes condicions en cada pou. Els cultius que assoleixen una concentració cel·lular màxima són les CMMA sembrades a $4E+03$ cèl·lules/cm², on s'observa una proliferació que arriba fins a $1E+05$ cèl·lules/cm², en el que s'observa l'inici de la fase estacionària del creixement cel·lular. En les densitats restants, la concentració cel·lular màxima varia entre $4E+04$ cèl·lules/cm² i $9E+04$ cèl·lules/cm². Pel que fa a la fase de latència, és més llarga pels cultius amb una concentració cel·lular inicial menor (Levin 2002) perquè les cèl·lules modifiquen els seus patrons metabòlics de consum en funció de la densitat cel·lular, fenomen conegut des de fa bastant temps, tant per a cultius de cèl·lules animals en suspensió (Sand et al. 1977), com pels cultius de cèl·lules animals adherents (Hu et al. 1985). En el cas de les dues densitats de sembra superiors, no s'observa pràcticament fase de latència, des del moment del rentat les cèl·lules han començat a créixer exponencialment, fet que es reflecteix també en el consum de glucosa, on s'observa l'inici d'aquest consum a partir del dia 5, al igual en el rentat a 3 dies, coincidint en el moment del rentat. Aquest podria ser un indicador d'activitat metabòlica per a cultius de cèl·lules mesenquimals, on en el cas de no purificar bé les CMN i no aïllar les CMMA, no es trobaria cap consum de glucosa o aquest seria mínim.

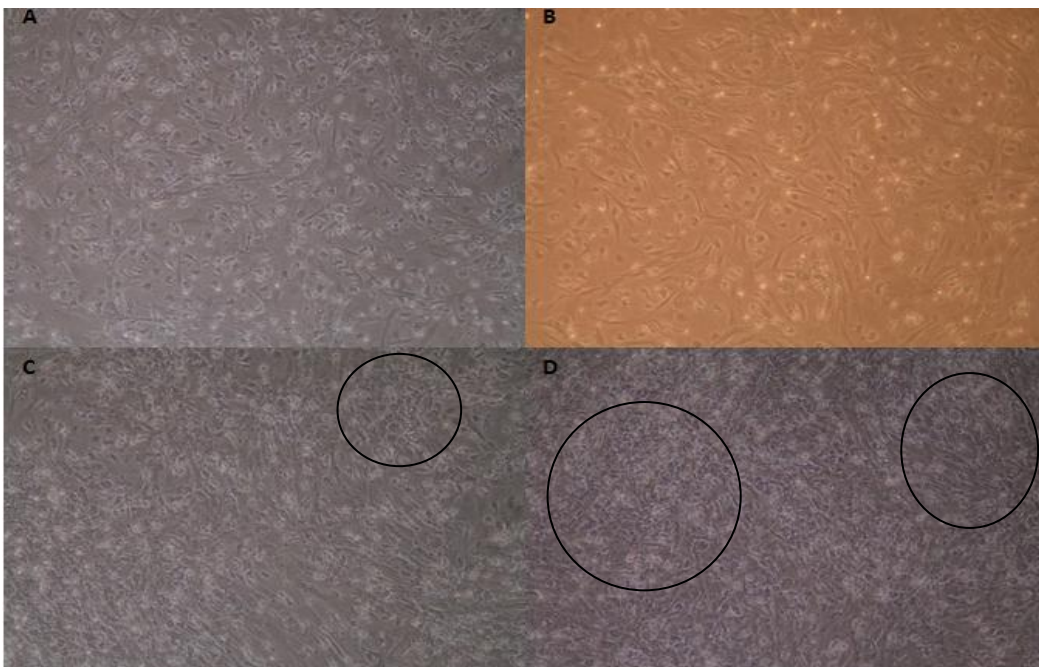


Figura 3.10. Cultius de CMMA expandides fins al dia 10 de cultiu, després de rentar les CMN 5 dies després de sembrar-les. Es poden observar les diferents densitats de confluència que s'obtenen amb les diferents densitats de sembra $1E+05$ CMN/cm² (A), $2E+05$ CMN/cm² (B), $4E+05$ CMN/cm² (C) i $6E+05$ CMN/cm² (D). Encerclat en negre s'observen zones on el creixement ha arribat a la confluència.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, a la figura 3.10, s'observa amb més claredat el fenomen d'inhibició per contacte. En un cultiu amb una concentració cel·lular baixa les cèl·lules es troben més separades les unes de les altres (foto A), de manera que pràcticament no es troben inhibides per contacte i, per tant, poden créixer a la seva velocitat màxima de creixement.

Es poden observar cèl·lules fibroblàstiques i altres més petites que no presenten la morfologia fibroblàstica, no presenten les prolongacions típiques, fet que reforça la necessitat de trobar marcadors específics per a cèl·lules mare mesenquimals. Si aquests cultius s'utilitzen per una expansió, aquestes poblacions de cèl·lules no fibroblàstiques són eliminades en gran part per la dilució que es produeix en el moment del subcultiu d'aquest cultiu primari de CMMA, on només les CMMA es desadhereixen amb la tripsina i la resta de cèl·lules no fibroblàstiques queden adherides al plàstic. A mesura que es va augmentant la concentració cel·lular inicial, el número de grups de cèl·lules fibroblàstiques va augmentant fins a arribar a un moment (figura 3.10-D) en que pràcticament el número de cèl·lules no fibroblàstiques no es significatiu. En canvi això fa que es vagi incrementant progressivament la quantitat de cèl·lules que es troben inhibides per contacte cel·lular, fent que la velocitat de creixement del cultiu vagi disminuint significativament. Com es pot observar, a la densitat de sembra superior (figura 3.10-D), no hi ha cap espai buit i tot són grups de cèl·lules fibroblàstiques petites, i amb 10 dies d'expansió s'ha arribat a la confluència màxima, les cèl·lules es troben en la fase estacionària del creixement cel·lular, on existeix una limitació física per manca de superfície i, es dona el fenomen d'inhibició per contacte que fa que el creixement s'aturi.

A continuació es mostren els valors numèrics de l'evolució del creixement cel·lular amb les equacions que es mostren a continuació com a resum de l'apartat 7.8, on es descriuen en més profunditat i s'exemplifica el seu càlcul. En primer lloc, per calcular la velocitat màxima de creixement, s'integra l'equació que defineix l'augment la concentració cel·lular en un sistema discontinu, es pot aïllar el primer dels valors que ens servirà per comparar els diferents resultat, la velocitat específica màxima de creixement (μ_m). El valor de la velocitat específica de creixement màxima, que correspon a la fase de creixement exponencial, s'obté a partir del pendent resultant de l'ajust lineal de l'equació 3.1. Amb la μ_m , es pot determinar el temps que les cèl·lules requereixen per duplicar la seva concentració (t_d), a partir de l'equació 3.2. El factor d'expansió per a un subcultiu és el factor pel qual es multiplica la concentració cel·lular inicial (Concentració cel·lular el dia 3 de cultiu en el cas de R3 i el dia 5 en R5) per tal d'obtenir la concentració cel·lular

final. És un valor bastant utilitzat a la bibliografia i es calcula mitjançant l'equació 3.3. Per últim es calcula els valors de q_{glu} (consum específic de glucosa), q_{lac} (producció específica de lactat) i que s'obtenen de la pendent resultant de la linealització de la relació entre la variació de la concentració de glucosa o lactat, respectivament, amb la integral de la concentració cel·lular (ICV) (Equació 3.4.).

$$\ln Cc = \ln Cco + \mu_m(t - tlag)$$

Equació 3.1. On μ_m =velocitat específica màxima de creixement.; Cc= Concentració cel·lular; Cco= Concentració cel·lular inicial.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_m}$$

Equació 3.2. On t_d = temps de duplicació; μ_m = velocitat específica màxima de creixement.

$$\text{Factor d'expansió} = \frac{Cco}{Ccf}$$

Equació 3.3. Factor d'expansió. On Cco=concentració cel·lular inicial; Ccf=concentració cel·lular final.

$$ICV = \int_0^t Cc dt = \sum_{i=0}^{n-1} [Cci(t_{i+1} - t_i)]$$

Equació 3.4. Concentració cel·lular acumulada (ICV). Cci,i és la mitjana de les concentracions de cèl·lules viables en el interval de temps entre t_{i+1} i t_i .

A la taula 3.2 es presenten els valors d'aquestes diferents variables pels experiments realitzats d'expansió de CMMA amb diferents inòculs i temps de rentat.

Taula 3.2. Dades cinètiques del creixement de, CMMA provinents de MO ovi ,a diferents densitat de sembra i diferents temps de rentat. μ_{max} : velocitat específica màxima de creixement.; T_{dup} : temps de duplicació; q_{gluc} : Consum específic de glucosa; q_{lac} : Producció específica d'àcid làctic; Yp/s : Rendiment subproducte-substrat.

Inòcul (cell/cm ²)	μ_{max} (dies ⁻¹)	t_{dup} (dies)	Cc final (CMMA/cm ²)	Factor expansió	q_{gluc} ($\mu\text{mol}/(10^6$ cells*dia))	q_{lac} ($\mu\text{mol}/(10^6$ cells*dia))	Yp/s
1e5 CMN R3	0.55	4.96	3.0E+04	32.06	0.97	4.13	3.52
2e5 CMN R3	0.47	1.48	4.4E+04	39.54	1.21	4.16	2.13
4e5 CMN R3	0.30	2.34	5.9E+04	9.55	0.90	4.02	2.50
6e5 CMN R3	0.27	2.61	5.9E+04	7.37	0.97	3.81	1.90
1e5 CMN R5	0.26	2.67	6.2E+04	66.36	1.26	5.57	2.14
2e5 CMN R5	0.56	2.75	4.1E+04	36.71	1.26	5.57	2.54
4e5 CMN R5	0.45	1.76	1.0E+05	16.60	1.36	4.00	1.80
6e5 CMN R5	0.34	2.04	9.4E+04	11.81	1.56	4.52	1,85

En el cas del rentat a 3 dies, si s'observen les velocitats específiques màxima de creixement (μ_{\max}) obtingudes, de 0.55, 0.47, 0.30 i 0.27 hores⁻¹ pels inòculs de 1E+05, 2E+05, 4E+05, 6E+05 CMN/cm² respectivament, es pot veure que els cultius cel·lulars es troben influenciats segons la concentració inicial a la que es troben inoculats, de manera que la màxima μ_{\max} a la que arriben és inferior a mesura que l'inòcul va augmentant. La diferència més gran de μ_{\max} es troba entre els inòculs de 1E+05 CMN/cm² i 6E+05 CMN/cm², amb una disminució del 51% en aquest segon inòcul.

En el cas del rentat a 5 dies es pot observar que les velocitats específiques màxima de creixement (μ_{\max}) obtingudes, de 0.26, 0.25, 0.45 i 0.34 hores⁻¹ pels inòculs de 1E+05, 2E+05, 4E+05, 6E+05 CMN/cm² respectivament, no presenten la mateixa relació. Si s'observa un augment de l'inòcul 4E+05 respecte al 6E+05, però disminueixen un cop es disminueix la densitat de sembra a 1 o 2E+05. En el cas de la sembra a 1E+05 per al rentat als 3 dies, s'observa un valor μ_{\max} inferior a l'esperat segons la relació inversa inòcul- μ_{\max} . Aquest fet pot estar relacionat amb la confluència dels cultius. Al igual que les cèl·lules presenten un fenomen d'inhibició per contacte que es presenta més ràpidament amb densitats de sembra més altes, es pot pensar en la possibilitat d'un valor mínim de sembra per als cultius de CMMA.

En el cas del rentat als 5 dies, la diferència màxima respecte la μ_{\max} que es troba entre dos inòculs diferents, no supera el 30%. Aquest fet pot ser explicat per la confluència, al realitzar el rentat més tard, les cèl·lules presenten una inhibició per contacte més ràpida i llavors la μ_{\max} no augmenta tant com en el cas del rentat als 3 dies.

Els rendiments subproducte/substrat, on obtenim valors dintre del rang 1.8-3.52, no són consistents amb l'equimolaritat 1:2 que presenten la glucosa i el lactat. Aquest fet pot ser degut a que la fase de latència en les CMMA provinents de moll d'os es troba emmascarada per la presència de les CMN. A la figura 3.7 i 3.9 s'observa que les corbes de glucosa no disminueixen fins que no s'eliminen les CMN mitjançant el rentat amb PBS al dia 5, tot i així, es dilata més en els casos de les densitats de sembra més baixes on hi ha menys consum. Al no haver-hi consum de glucosa fins al final de l'experiment, no es disposen de les dades suficients per obtenir el càlcul dels pendents que reflecteixen la velocitat específica de consum de glucosa i producció de lactat que serveixen per calcular el rendiment producte/substrat.

3.1.3. Caracterització de la cinètica de creixement de CMMA provinents de cartílag articular.

De forma semblant al cas anterior, s'estudia la cinètica de creixement de cèl·lules provinents d'una font diferent, el cartílag articular, estudiant tres densitats cel·lulars: $1E+03$, $2.5E+03$ i $5E+03$ cèl·lules/cm². En aquest cas, el protocol d'aïllament i expansió no presenta cap rentat de CMN, ja que aquestes no es troben presents. Dels condrocits que es disgreguen enzimàticament es desdiferencien i s'adhereixen al plàstic només aquelles cèl·lules que són CMMA. Per tant, les ordres de magnitud dels inòculs són diferents ja que es sembren condrocits disgregats que es troben amb menor nombre que les CMN al MO. Les condicions de cultiu han estat equivalents a tots els experiments, amb un medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% de sèrum, a una temperatura de 37°C en un incubador de CO₂ al 95% d'humitat.

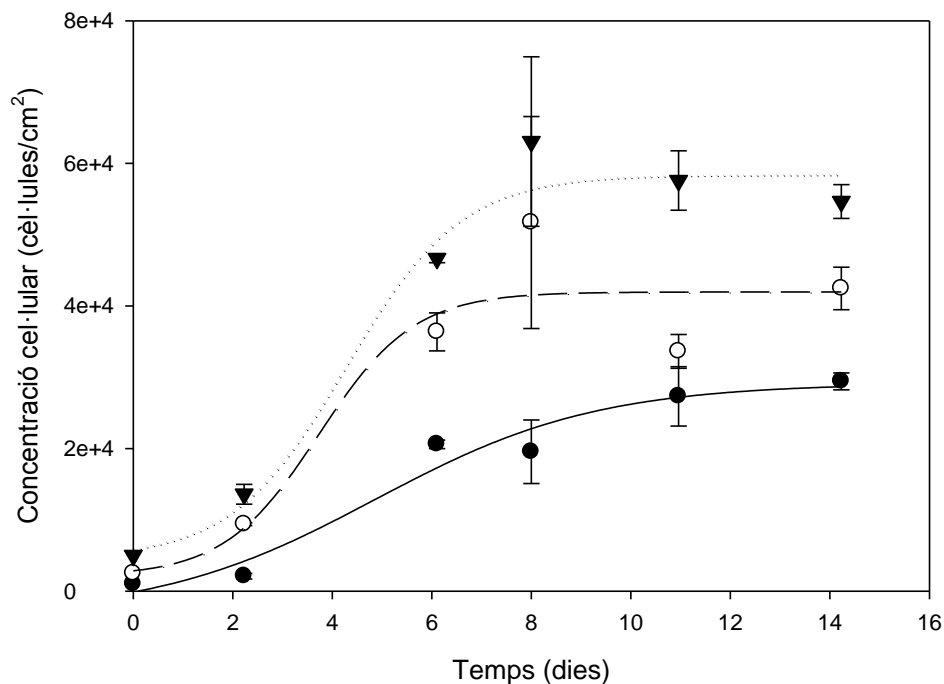


Figura 3.11. Perfils de creixement de CMMA derivades de cartílag hialí, a diferents densitats de sembra $1E+03$ (●), $2.5E+03$ (○) i $5E+03$ (▼). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

El comportament de les CMMA de cartílag oví respecte la densitat de sembra (figura 3.11) és el mateix que els de les CMMA provinents de moll d'os. Si s'augmenta la densitat de sembra, s'augmenta també el temps de duplicació, ja que disminuïm la velocitat específica de creixement màxima (μ_{max}), i el factor d'expansió. En el cas de les CMMA provinents de cartílag articular

s'observen unes fases de latència pràcticament inexistent, a diferència del que s'observava abans en les CMMA de moll d'os on s'observaven fases de latència fins i tot de 8 dies, també degut a que les cèl·lules s'han d'adherir i separar de la fracció hematopoètica de les CMN. El primer que destaca és també la concentració cel·lular màxima de CMMA a la que s'arriba en cultius de CMMA de cartílag ($6-7E+04$ cèl·lules/cm²), molt inferior a l'obtinguda respecte al moll d'os ($1E+05$ cèl·lules/cm²), aproximadament un 40% menys en els millor dels casos. A la figura 3.12 s'observen els perfils de consum de glucosa i producció de làctic, similars als de CMMA provinents de moll d'os, encara que en aquest cas s'observa més activitat metabòlica, arribant-se a esgotar els nutrients en els cultius, en el quals no s'ha fet cap recanvi de medi.

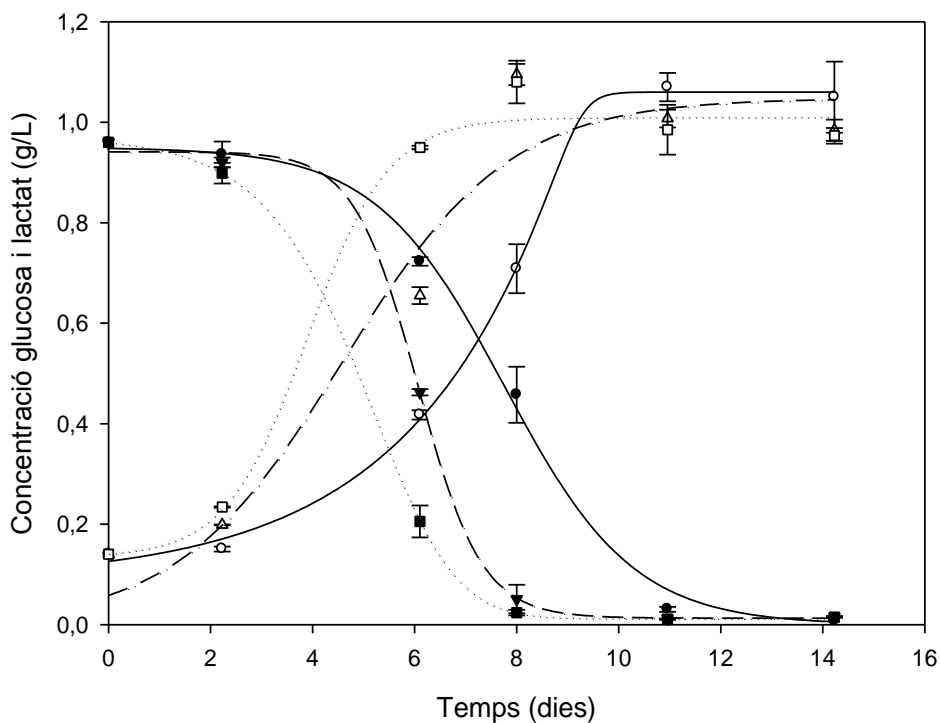


Figura 3.12. Perfils de consum de glucosa i producció de lactat, de CMMA provinents de cartílag hialí a diferents densitats de sembra. Glucosa (▼) i lactat (▽) per a l'inòcul de $1E+03$ cell/cm²; Glucosa (■) i lactat (□) per a l'inòcul de $2.5E+03$ cell/cm²; Glucosa (◆) i lactat (◇) per a l'inòcul de $5E+03$ cell/cm²; cèl·lules/cm²(●). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

Les CMMA provinents de cartílag articular semblen, de l'anàlisi de les dades, molt actives metabòlicament (figura 3.12), a diferència dels condrocits que es troben al cartílag hialí sa adult, on es troben en estat G0 amb una activitat metabòlica basal (Kusuzaki et al. 2001). Les tres densitats de sembra més baixes tarden més en començar a consumir la glucosa i produir lactat. A la figura 3.12 es pot observar una correlació entre el punt d'esgotament de la glucosa al dia 6 i el

punt d'aturada del creixement cel·lular el dia 6 en el cas de l'inòcul més alt. La concentració cel·lular final no és la màxima aconseguida durant el cultiu. En el cas de l'inòcul de 2.5E+03 CMMA/cm² s'arriba fins a 5.2E+04CMMA/cm², un 24% més respecte la concentració cel·lular final del cultiu a dia 14. En el cas de l'inòcul 5.0E+03 CMMA/cm² la disminució entre el valor de concentració cel·lular màxima assolida durant el cultiu i la concentració final és del 16%. Aquesta disminució pot ser deguda als efectes tòxics de l'acumulació d'àcid làctic al cultiu. A la taula 3.3 es recullen les dades cinètiques i metabòliques de les CMMA de cartílag sembrats a diferents densitats.

Taula 3.3. Dades cinètiques del creixement de CMMA provinents de cartílag hialí ,a diferents densitat de sembra. μ_{max} : velocitat específica màxima de creixement.; T_{dup} : temps de duplicació; q_{gluc} : Consum específic de glucosa; q_{lac} : Producció específica d'àcid làctic; Yp/s : Rendiment subproducte-substrat.

Inòcul (cell)	μ_{max} (dies ⁻¹)	t_{dup} (dies)	Cc final (CMMA/cm ²)	Factor expansió	q_{glu} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	q_{lac} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	Yp/s
1,0E+03	0.51	1.37	2.9E+04	29.42	8.28	16.66	1.91
2,5E+03	0.38	1.85	4.2E+04	20.68	7.61	15.74	1.78
5,0E+03	0.32	2.17	5.5E+04	12.61	12.45	25.7	1.76

En aquest cas l'explicació a la baixa densitat cel·lular aconseguida amb l'inòcul més baix ha estat l'esgotament de nutrients. El dia 10 del cultiu, està totalment exhaurida la glucosa que contenia el medi, llavors les cèl·lules tenen una aturada del creixement immediata. Es podria pensar el mateix de les altres densitats de sembra, però en el capítol 5 es demostra que no es així. En canvi sí es podria mantenir la concentració cel·lular màxima assolida durant el cultiu amb un control més acurat dels nutrients, amb recanvis de medi per eliminar l'àcid làctic del medi i evitar així la disminució de la concentració cel·lular.

En general, s'observa que el metabolisme de les CMMA en monocapa provinents de cartílag articular presenta una activitat similar a les CMMA provinents de moll d'os. Les velocitats de consum de glucosa i la velocitat màxima de creixement són similars comparant el millor cas de cada font cel·lular, 0.51h⁻¹ en el cas de les CMMA de cartílag (1.0E+03) i 0.56h⁻¹ en les de MO (4.0E+05 R5). A la taula 3.3 s'observa una tendència ascendent de la velocitat de consum de glucosa en funció de la densitat de sembra. Hi ha un relació directa entre la velocitat específica de creixement i el consum de glucosa, a més densitat, més consum. La velocitat de producció de lactat és major en el cas de màxima densitat de sembra, on es troben valors superiors a les dues

densitats de sembra més baixes. Pel que fa al rendiment subproducte/substrat, s'obtenen valors pròxims a 2, que són consistents amb l'equimolaritat 1:2 que presenten la glucosa i el lactat.

En resum, s'ha establert un protocol per expandir CMMA, provinents tant de moll d'os com de cartílag, el que permet afirmar que el cultiu de llarga durada de CMMA ovins es possible, tot controlant els nutrients del medi, ja que aquests poden ser un factor limitant en el cas de les CMMA provinents de cartílag hialí.

3.1.4. Caracterització de la cinètica de creixement de CMMA provinents de greix.

S'analitza finalment el creixement de les cèl·lules provinents d'una tercera font, el teixit adipós, estudiant també 3 densitats cel·lulars: $1E+03$, $2.5E+03$ i $5E+03$ cèl·lules/cm². Les condicions de cultiu han estat equivalents als anteriors experiments.

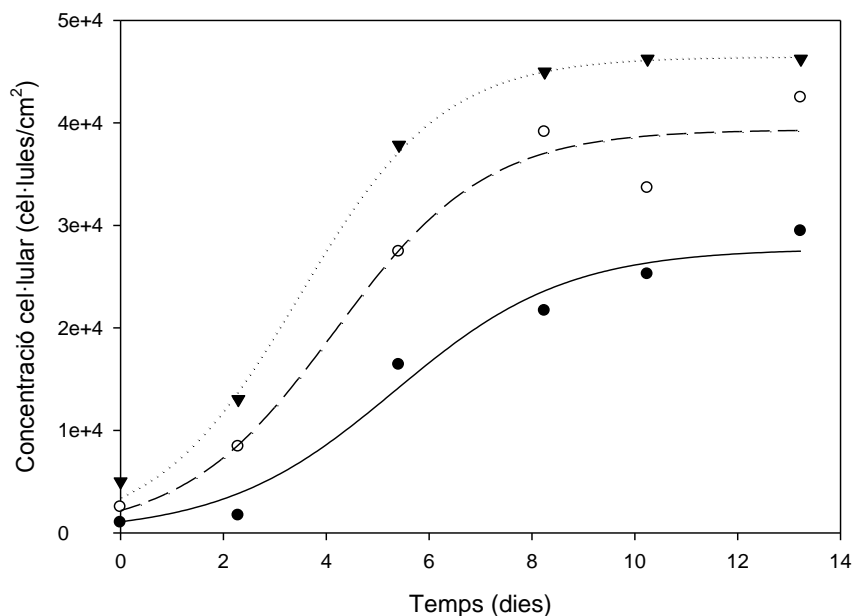


Figura 3.13. Perfils de creixement de CMMA derivades de greix, a diferents densitats de sembra $1E+03$ (●), $2.5E+03$ (○) i $5E+03$ (▼). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

A la figura 3.13 es representen les tres densitats de sembra que s'han provat en el cas de les CMMA provinents de teixit adipós. Els perfils de creixement són molt similars a les CMMA provinents de cartílag articular. No s'observen fases de latència en cap de les densitats assajades.

Si es tingués en compte els temps d'aïllament enzimàtic, es podria assimilar aquest al temps de latència, però no és així perquè en el cas de les CMMA provinents de moll d'os, hi ha CMMA des de les primeres 24 hores adherides al plàstic, i la fase de latència que presenten és superior a la de CMMA provinents de cartílag articular i greix. Tal i com ocorre en les CMMA de cartílag articular, la concentració cel·lular màxima a la que s'arriba en cultius de CMMA de greix és inferior a la obtinguda amb les CMMA de moll d'os, aproximadament un 40% menys en el millor dels experiments, fins i tot inferior a la obtinguda en les CMMA de cartílag articular, al voltant de $6E+04$ cèl·lules/cm² en els CMMA de cartílag articular i $5E+04$ cèl·lules/cm² en les CMMA de greix.

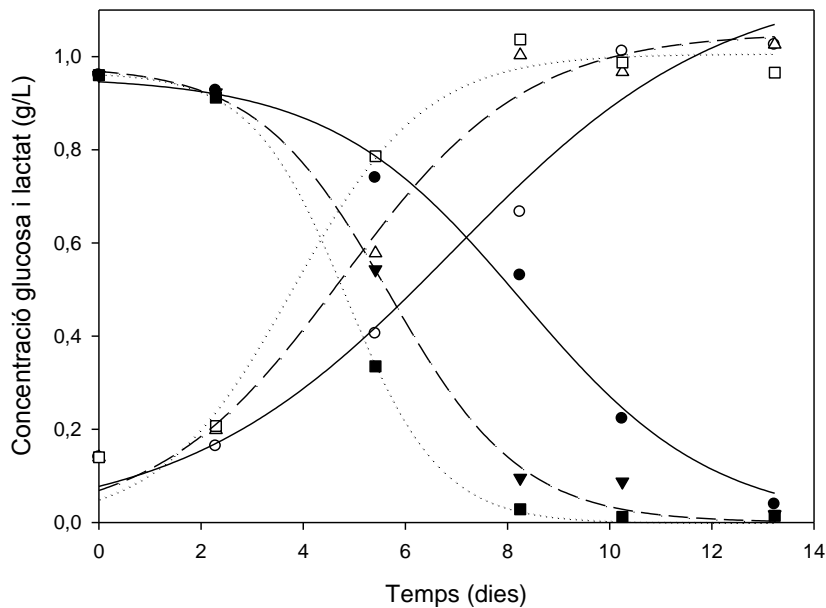


Figura 3.14. Perfils de consum de glucosa i producció de lactat de CMMA derivades de greix, a diferents densitats de sembra. Glucosa (▼) i lactat (▽) per a l'inòcul de $1E+03$ cell/cm²; Glucosa (■) i lactat (□) per a l'inòcul de $2.5E+03$ cell/cm²; Glucosa (◆) i lactat (◇) per a l'inòcul de $5E+03$ cell/cm²; cèl·lules/cm² (○). Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% de sèrum. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C.

A la figura 3.14 s'observen els perfils de consum de glucosa i producció de làctic, que són similars als obtinguts en les CMMA de cartílag articular (figura 3.12), on també s'observa un augment de l'activitat metabòlica en comparació amb les CMMA provinents de moll d'os, arribant a esgotar els nutrients en cultius en els quals no s'ha fet cap recanvi de medi. Aquí es podria pensar en una inhibició del creixement per esgotament de nutrients cap al dia 10 de cultiu, o a una toxicitat cel·lular provocada per l'acumulació d'àcid làctic. En aquest cas no s'han realitzat experiments posteriors amb recanvis de medis, però al capítol 5 s'observa la variabilitat individual que existeix entre els diferents cultius dels animals utilitzats per a l'assaig preclínic. En el cas dels

cultius de CMMA derivades de greix on sí es recanvia el medi, no s'arriba mai a la densitat cel·lular $6E+04$ cèl·lules/cm². Per tant és més probable que existeixi una aturada de la proliferació per altres motius que no siguin l'esgotament de nutrients, com la inhibició per contacte.

Es torna a trobar una relació inversa entre la densitat de sembra i la velocitat específica de creixement, tal i com es mostra a la taula 3.4. Les CMMA provinents de greix oví es comporten exactament de forma semblant a les altres fonts cel·lulars. Si s'augmenta la densitat de sembra, augmenta el temps de duplicació, ja que disminueix la velocitat específica de creixement màxima (μ_{max}) i el factor d'expansió. Els perfils metabòlics (figura 3.14) són similars als de les CMMA de cartílag articular (figura 3.12). Hi ha una disminució en la producció de lactat específica d'un 28% i una disminució en el consum de glucosa del 25%. Aquest fet podria explicar que les CMMA de cartílag articular arribin a una concentració cel·lular superior. En les CMMA de greix també s'ha observat un esgotament de nutrients el dia 8 per a les dues densitats més altes de sembra assajades. En canvi, no és fins el dia 12 que apareix l'esgotament de nutrients en el cas de la densitat més baixa, $1E+03$ cèl·lules/cm², però en canvi, si que s'observa l'esgotament el dia 10 (figura 3.14) com demostra l'entrada en la fase estacionària. Aquesta dada referma la idea de que els problemes de proliferació en la fases avançades del creixement, es poden atribuir, en gran part, més a un fenomen d'inhibició per contacte que a una falta de nutrients que inhibeixi el creixement cel·lular. Juntament amb la dada avançada anteriorment, en que s'ha observat que en cultius on es recanvia el medi mai es sobrepassa la densitat $5E+04$ cèl·lules/cm², es pot intuir un problema d'inhibició per contacte en les CMMA de greix a densitats al voltant de $4-5E+04$ cèl·lules/cm². El fenomen d'inhibició per contacte o problemes per inhibició de creixement per metabòlits com el lactat, podrien afectar el creixement de les CMMA de greix. El rendiment subproducte/substrat, on obtenim valors pròxims a 2 són consistents amb l'equimolaritat 1:2 que presenten la glucosa i el lactat. En aquest cas també s'observa que la concentració cel·lular final no és la màxima aconseguida durant el cultiu, com per exemple en el cas de l'inòcul de $2.5E+03$ CMMA/cm², però la disminució de la concentració respecte aquet màxim no es tan acusada com en el cas de les CMMA de cartílag articular.

Aquest fenomen de proporcionalitat inversa entre la concentració cel·lular inicial i la velocitat màxima de creixement a la que arriba un cultiu és un fet intrínsec pels cultius de cèl·lules animals adherents (Sekiya et al. 2002), que pateixen una inhibició per contacte cel·lular i, per tant, les afecta en major grau com més elevada és la concentració cel·lular (Abercrombie et al. 1962).

Taula 3.4. Dades cinètiques del creixement de CMMA provinents de greix oví ,a diferents densitat de sembra. μ_{max} : velocitat específica màxima de creixement.; T_{dup} : temps de duplicació; q_{gluc} : Consum específic de glucosa; q_{lac} : Producció específica d'àcid làctic; Yp/s : Rendiment subproducte-substrat.

Inòcul (cell)	μ_{max} (dies ⁻¹)	t_{dup} (dies)	Cc final (CMMA/cm ²)	Factor expansió	q_{glu} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	q_{lac} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	Yp/s
1,00E+03	0.53	1.31	2.8E+04	29.43	7.30	17.56	1.92
2,50E+03	0.34	2.07	4.3E+04	16.98	9.17	17.86	1.88
5,00E+03	0.28	2.55	4.6E+04	9.25	9.18	18.44	1.75

Pel que fa a la comparació entre diferents fonts, s'observa a la taula 3.6, en analitzar les millors dades obtingudes en cada cas, una velocitat específica màxima de creixement superior en el cas de les CMMA de cartílag articular i de moll d'os. En el cas de CMMA de moll d'os, s'ha comparat amb el valor de sembra de CMN de 4E+05 cèl·lules/cm², per tant no es del tot equiparable, però és el valor que, a dia 2 de cultiu post-rentat de CMN, s'aproxima més a la densitat de 2,5E+03 cèl·lules/cm² de les altres dues fonts.

La concentració cel·lular final obtinguda, en el cas de les CMMA de moll d'os és comparable, o inclús supera les dades publicades en altres treball d'investigació. Per exemple, Rentsch i col·laboradors (Rentsch et al. 2010), arriben a 3E+04 cèl·lules/cm² en 10 dies d'expansió. Aquesta dada representa un 70% dels resultats aconseguits amb la metodologia desenvolupada en aquest treball.

Taula 3.5. Dades cinètiques del creixement de CMMA ovines sembrades a 2,5E+03 cèl·lules/cm². μ_{max} : velocitat específica màxima de creixement.; T_{dup} : temps de duplicació; q_{gluc} : Consum específic de glucosa; Q_{lac} : Producció específica d'àcid làctic; Yp/s : Rendiment subproducte-substrat.

Font cel·lular	μ (dies ⁻¹)	t_{dup} (dies)	Cc final (CMMA/cm ²)	Factor expansió	q_{gluc} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	q_{lac} (μ mol/10 ⁶ cell·h)	Yp/s
CMMA de cartílag	0,3749	1,85	4.2E+04	20,68	7,61	15,736	1,78
CMMA de greix	0,335	2,07	4.3E+04	16,98	9,17	17,86	1,88
CMMA de MO	0,39	1,76	4.4E+04	16,60	1,36	4,00	1,80

3.1.5. Caracterització de les CMMA mitjançant l'anàlisi de marcadors de superfície.

L'anàlisi de marcadors de superfície és una eina molt important en la caracterització cel·lular. En el cas de les cèl·lules humanes, a més de la capacitat d'adherència al plàstic de les cèl·lules i la multipotencialitat, l'ISCT estableix una tercera característica addicional que s'han d'acomplir per definir una cèl·lula humana com a mare mesenquimal (Dominici et al. 2006), l'expressió d'un determinats marcadors de superfície. Tenint en compte aquest requisit, es planteja ara l'anàlisi del fenotip cel·lular de les cèl·lules ovines, l'expressió de marcadors de superfície que caracteritzen aquestes cèl·lules ovines.

El treball amb una espècie com l'ovina dificulta en gran mesura aquest anàlisi per la manca d'anticossos específics. Així doncs, s'han utilitzat anticossos humans per comprovar si quan aquests s'utilitzen a les CMMA de moll d'os d'origen oví, mantenen la reactivitat front a antigens específics característics d'aquestes cèl·lules.

Els marcadors positius per a cèl·lules mare mesenquimals humanes són CD90 i CD44, i els negatius CD45 i HLA-DR entre d'altres, però s'han confirmat aquests marcadors per a CMMA ovines (Mrugala et al. 2008). Aquesta és la raó per la qual van ser seleccionats els anticossos per realitzar la caracterització fenotípica de les CMMA ovines.

Es realitza l'anàlisi complet per les cèl·lules provinents de moll d'os, ja que són les cèl·lules que s'han considerat com a "gold standard" o de referència, perquè són les que més extensivament s'han estudiat durant els últims anys i les que més bons resultats han donat en els estudis d'expressió, a més de la seva capacitat de proliferació sense que es detectin anomalies a la morfologia cel·lular o el contingut cromosòmic.

Les cèl·lules van ser marcades amb els dos parells d'anticossos humans (CD44:CD45 i CD90:HLA-DR) i s'ha analitzat cada anticòs per separat amb un histograma amb el respectiu control negatiu, tal i com es mostra a la Figura 3.15. Els histogrames mostren que les CMMA derivades de moll d'os oví són, negatives per als marcadors CD45 i HLA-DR, i positives per a CD44 i CD90, tal i com es resumeix a la taula 3.6.

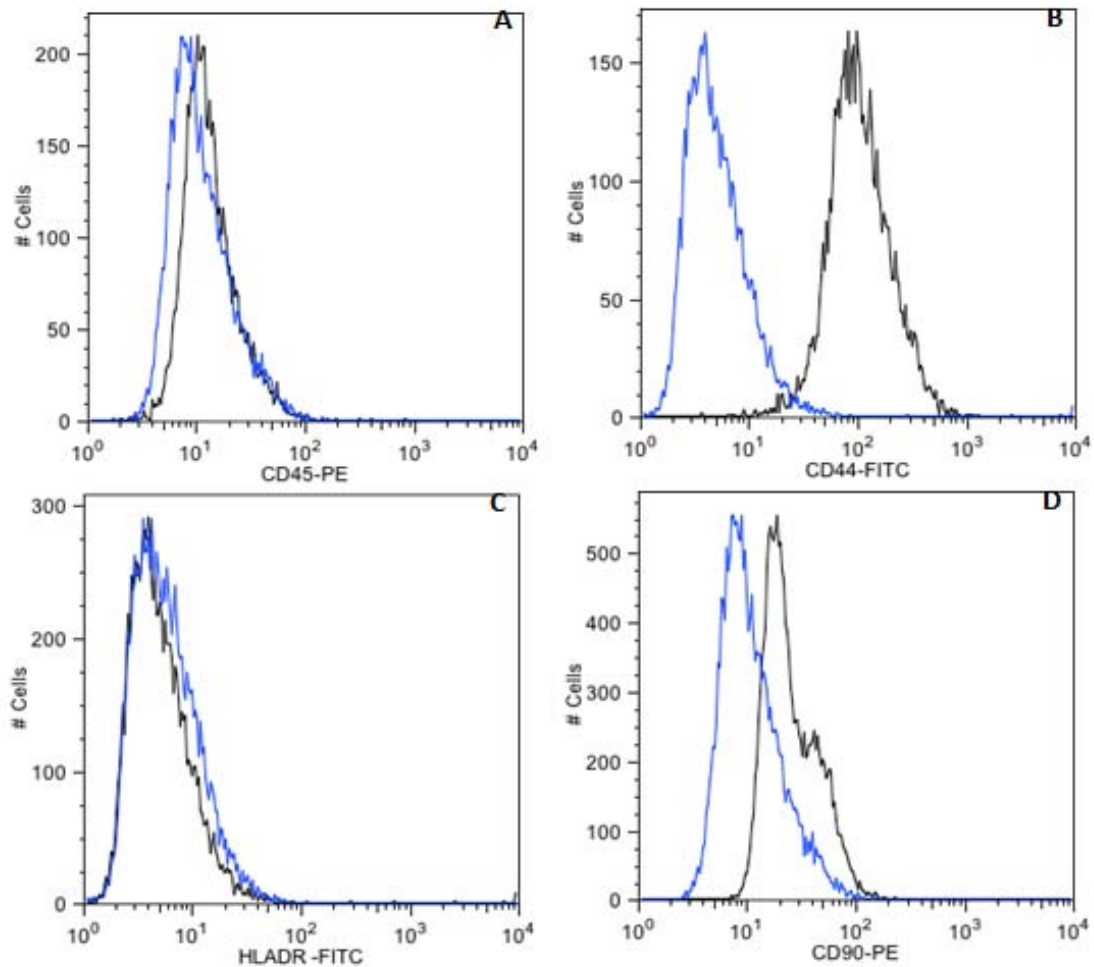


Figura 3.15. Histograma de CMMA procedents de moll d'os ovi i control negatiu amb anticòs isotip Ig i cèl·lules marcades amb l'anticòs (negre) A: anticòs CD45 humà (PE); B: anticòs CD44 humà (FITC); C: anticòs HLA-DR humà (FITC); D: anticòs CD90 humà(PE).

Taula 3.6. Fenotip de les CMMA derivades de moll d'os ovi.

Marcador	Marcatge en CMMA
CD44	+
CD45	-
CD90	+
HLA-DR	-

Per als anticossos humans antiCD44, CD45 y HLA-DR, el resultat és concordant amb els resultats esperats, ja que les CMMA marquen positiu per a CD44 i negatiu per a CD45 y HLA-DR (figura 3.15). La negativitat de CD45 demostra parcialment que les cèl·lules no són hematopoètiques, fet que reforça el mètode d'aïllament de la subpoblació mesenquimal desenvolupat durant aquest treball, basat en l'adherència de les CMMA en plàstic. En el cas del

CD90 (figura 3.15.D) s'aprecia un desplaçament del pic de les CMMA marcades amb l'anticòs respecte al seu control d'isotip, però no és un desplaçament total, per tant, no es pot afirmar que les CMMA siguin positives per a CD90, només potser ho són en un determinat percentatge. Aquest efecte pot ser degut a que l'anticòs és anti-humà i no reconeix perfectament al CD90 de les cèl·lules mesenquimals d'origen oví. Per aquesta raó cal confirmar la identitat d'aquestes cèl·lules com a mesenquimals amb més proves que demostrin aquesta multipotencialitat.

3.1.6. Avaluació de la multipotencialitat de CMMA derivades de moll d'os.

L'última característica que estableix l'ISCT com a requisit per anomenar una cèl·lula com a cèl·lula mare mesenquimal (Dominici et al. 2006) és la multipotencialitat d'aquesta. És a dir, que aquestes cèl·lules siguin capaces de dividir-se i diferenciar-se cap a diferents llinatges, establerts com a denominador comú: el llinatge osteogènic, adipogènic i condrogènic. S'han portat a terme diferents experiments de diferenciació amb cultius primaris de CMMA utilitzant kits comercials de diferenciació (StemPro® (Invitrogen)).

Les cèl·lules mare mesenquimals provinents de moll d'os oví es van fer créixer en un flascó de cultiu fins arribar al 80% de confluència, es van tripsinitzar les CMMA i es va generar el *micromass pellet*, tal i com s'explica a l'apartat 7.5.8. El *micromass pellet* es va cultivar durant 19 dies, llavors es van tenyir els cultius amb colorants específics per a teixit cartilaginós (Safranina O i Blau d'alcià). Com a control positiu es va utilitzar medi DMEM sense els suplementes condrogènics del kit Stempro®.

A la figura 3.16 s'observa l'evolució del cultiu del *micromass pellet* amb medi de diferenciació i amb varis controls. Les imatges ens mostren uns cultius molt diferents en cada cas. En el cas del cultiu control amb DMEM no suplementat amb els suplementes condrogènics, s'observa com el creixement va disminuint i les cèl·lules van perdent la morfologia fibroblàstica característica de les CMMA.

Tal i com s'observa a la figura 3.16, a la columna de la dreta (B,D,F), corresponent als control, les cèl·lules presenten una morfologia esfèrica i es creen agregats en les zones més distals al centre del pou on es va crear el pèl·let cel·lular. En canvi, els cultius amb medi de diferenciació mantenen en gran part la morfologia fibroblàstica i el pèl·let conserva la seva estructura íntegra.

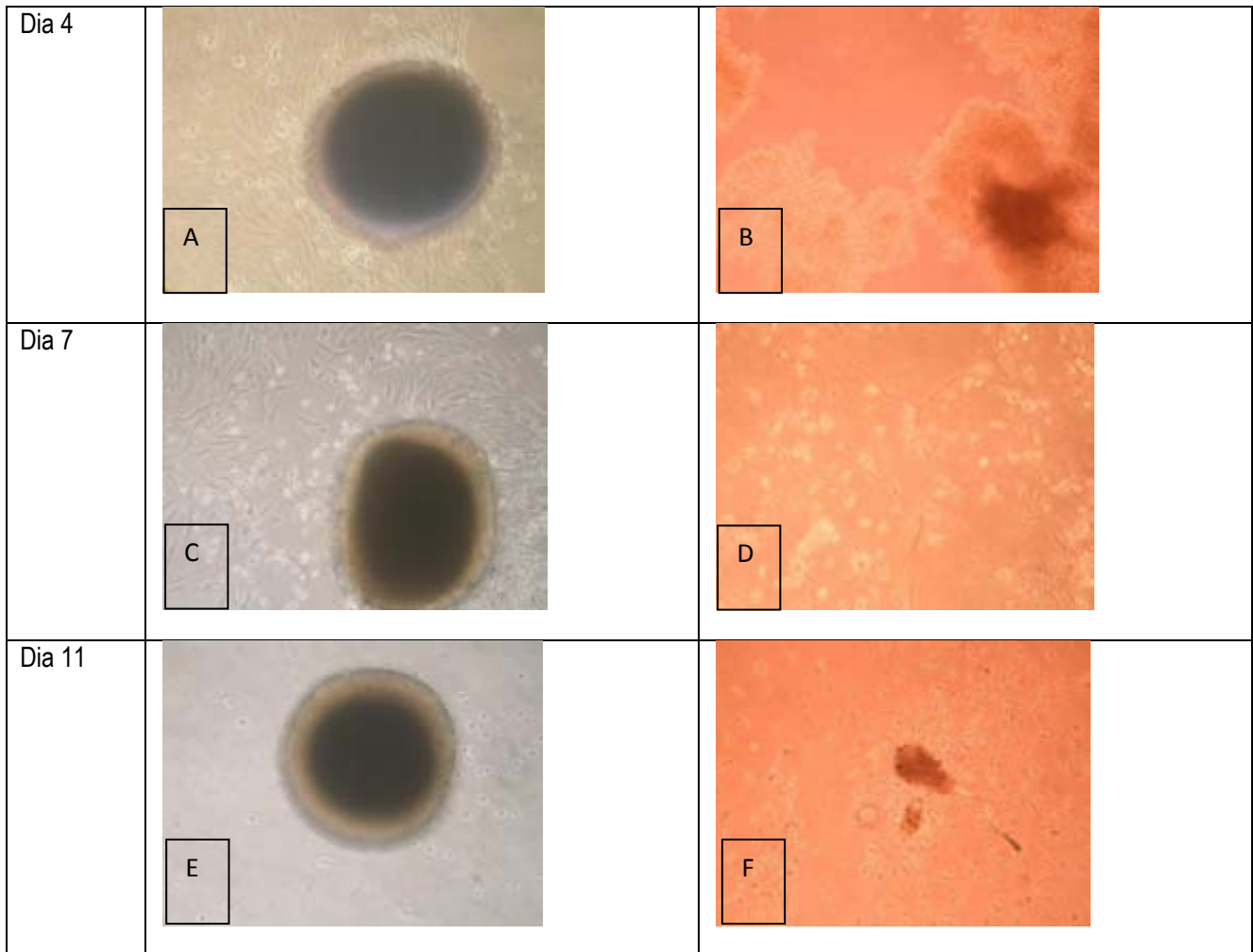


Figura 3.16. Morfologia cel·lular durant el cultiu del *micromass pellet*. El dia del cultiu s'indica a la columna de l'esquerra. A,C,E: Amb medi de diferenciació condrogènica. B,D,F: Control negatiu cultivat amb medi DMEM.

A la figura 3.17 es mostra la tinció de safranina O a 19 dies (C), observant-se un resultat positiu, el color vermell indica la tinció de proteoglicans. En el cas de la tinció als 13 dies, temps recomanat pel fabricant del kit, no s'observa una tinció molt forta, potser degut a la naturalesa ovina de les cèl·lules, ja que aquests medis estan definits per a cèl·lules humanes. En canvi, l'efecte és molt rellevant a dia 19.

En el cas dels controls negatius, a partir del dia 11-13 ja no s'observen cèl·lules adherents. Malgrat que en el cultiu amb medi de diferenciació tampoc s'observen moltes cèl·lules, les que hi resten presenten la morfologia fibroblàstica.

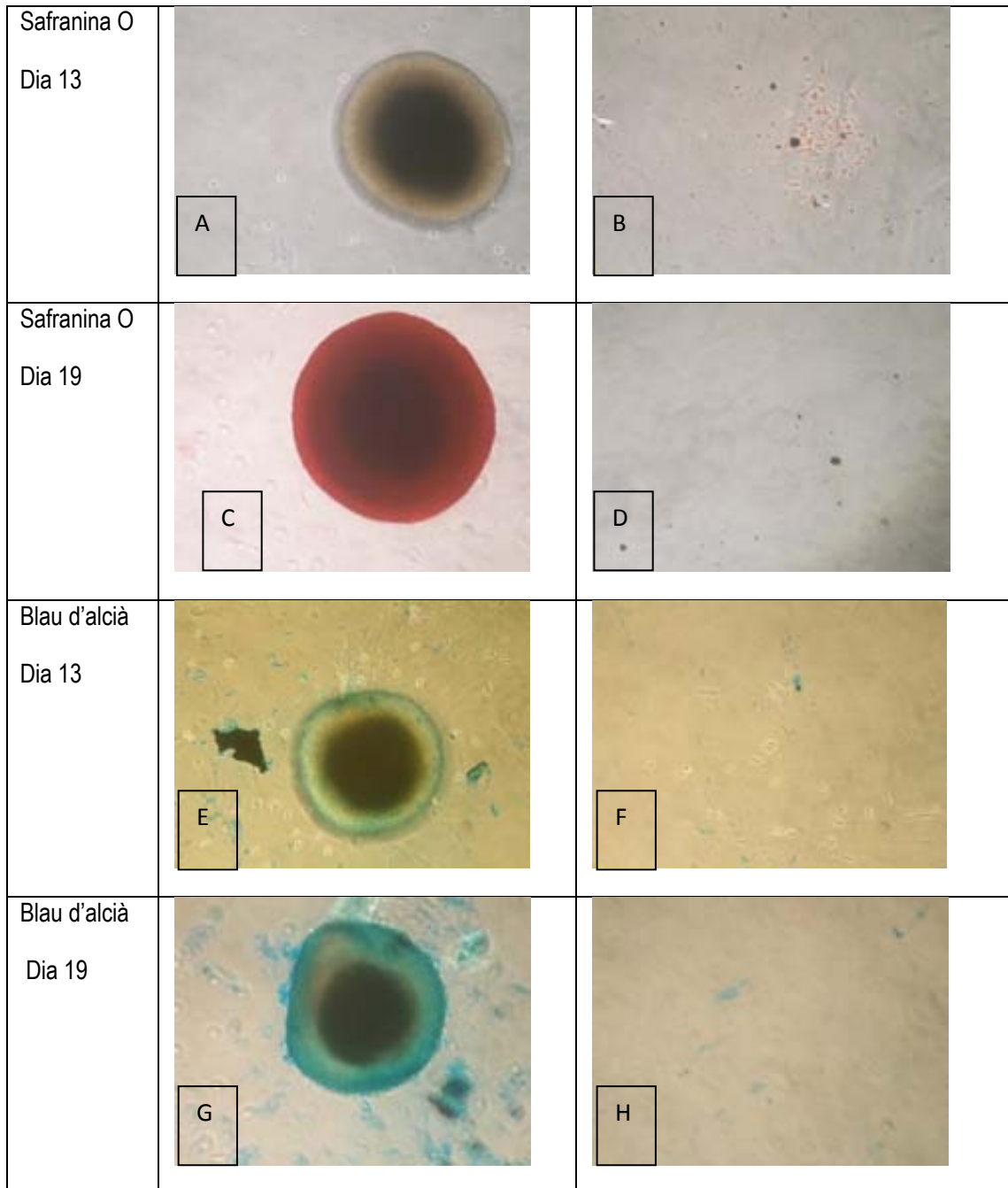


Figura 3.17. Resultats tincions amb Safranina O i Blau d'alcià. El dia de cultiu s'indica a la columna de l'esquerra. A-D: Safranina O. E-H: Blau d'alcià. A,C,E,G: Diferenciació condrogènica. B,D,F,H: Control negatiu cultivat amb medi DMEM.

Així doncs, els cultius de CMMA, al final del cultiu de durada 19 dies, tenyits amb safranina O i blau d'alcià han resultat ser positius per aquestes dues tincions específiques de teixit cartilaginós. Les tincions positives demostren la producció de components característics de la matriu cartilaginosa, com els proteoglicans. Els controls negatius només mostren una lleugera tinció de fons, però no correspon a cap estructura cel·lular. Per tant, es demostra la capacitat de diferenciació condrogènica de les CMMA provinents de moll d'os oví.

La segona característica que cal analitzar és la capacitat de les CMMA per diferenciar-se cap a adipòcits. S'ha utilitzat el Stem Pro[®] Adipogenesis kit. A la figura 3.18 es mostra el resultat obtingut. En aquests casos no cal recórrer a la tecnologia del *micromass pellet* i es realitzen cultius estàndards amb DMEM complementats amb els suplementes adipogènics que es tenyeixen amb Oil-red el dia 16 per demostrar la diferenciació adipogènica. En el cas de la diferenciació adipogènica, s'utilitza una tinció que demostra la presència de vacuoles a l'interior de la CMMA diferenciada a adipòcit madur. A la figura 3.18-A s'observa en vermell, indicades amb fletxes, les vacuoles lipídiques tenyides pel colorant, demostrant així la diferenciació adipogènica. A la figura 3.18-B s'observa el cultiu control negatiu amb DMEM sense suplementes de diferenciació, quan es tenyeix amb Oil red-O, que no mostra cap tipus de tinció.

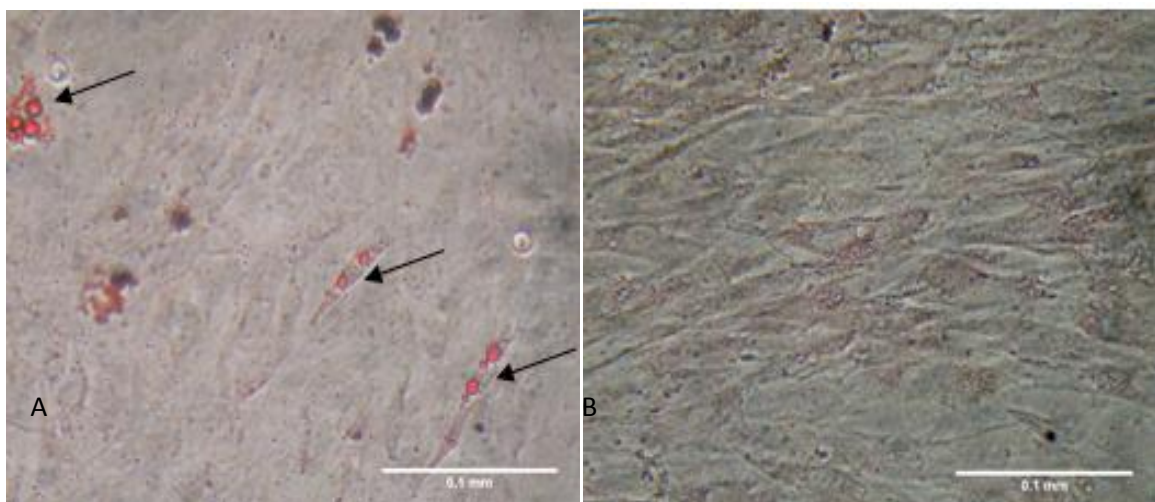


Figura 3.18. Diferenciació adipogènica. A: Diferenciació adipogènica als 16 dies tenyit amb Oil red – O, on s'observen les vacuoles lipídiques tenyides de vermell(→).; B: Control negatiu cultiu amb DMEM+10% sèrum pool oví als 16 dies tenyit per oil red–O.

Per últim, cal demostrar un tercer llinatge cap al qual es poden diferenciar les CMMA, l'osteogènic. S'ha utilitzat el Stem Pro[®] Osteogenesis kit. En el cas de la diferenciació osteogènica, s'han utilitzat dos mètodes diferents per demostrar la capacitat de diferenciació de les CMMA. En primer lloc la reacció de Von Kossa, una tinció que es fonamenta en una substitució de calci per plata. El nitrat de plata dona fosfat de plata o carbonat de plata, és a dir, la plata s'uneix només a la part aniònica de les sals de calci (fosfats o carbonats), i el producte que dona aquesta reacció es de color groc, però exposat a la llum canvia la seva coloració al negre per la reducció de la plata. Les cèl·lules que es diferencien cap a osteòcits, acumulen gran quantitat de calci, així doncs, es formen uns agregats que amb la tinció de Von Kossa s'observaran negres, tal i com es pot veure a la figura 3.19-A.

L'altre mètode utilitzat és la detecció de l'enzim fosfatasa alcalina, un dels enzims involucrats en la formació d'os. En condicions basals, les CMMA no l'expressen, però amb l'estimulació dels suplementos osteogènics, tal i com s'observa a la figura 3.19-B, s'observen els dipòsits de calci, la formació dels quals depèn de la fosfatasa alcalina.

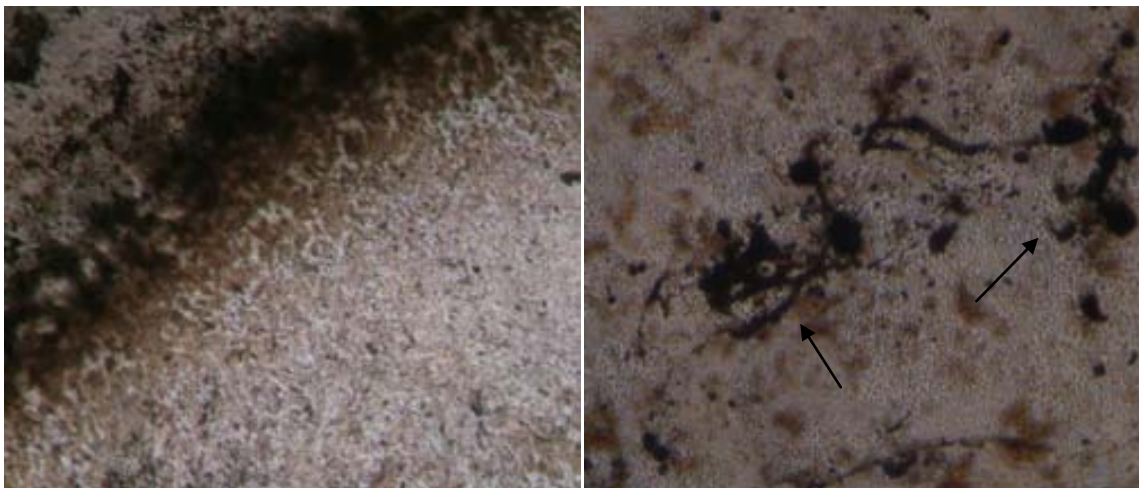


Figura 3.19. Diferenciació osteogènica positiva als 21 dies de cultiu amb medi de diferenciació tenyit amb Von Kossa (A) i amb la tinció de l'enzim fosfatasa alcalina. Els dipòsits de calci s'indiquen amb una fletxa (B).

Malgrat utilitzar kits de diferenciació per CMMA humanes, els resultats amb CMMA ovines són satisfactoris, permetent observar la multipotencialitat en aquestes últimes ja que els

mecanismes de diferenciació es conserven entre cèl·lules humanes i ovines. Així doncs, un cop demostrada la capacitat de diferenciació de les CMMA cap als 3 llinatges mesenquimals detallats en aquest capítol, condrocit, osteòcit i adipòcit, es posa de manifest la multipotencialitat de les CMMA ovines.

Així doncs, un cop caracteritzades les CMMA en cultiu, demostrada la seva pluripotencialitat, validat el sistema d'expansió amb sèrums autòlegs, en els següents capítols es procedeix al disseny d'un assaig preclínic per a la regeneració de defectes osteocondrals en model oví amb un teràpia basada en les CMMA i una biomatriu que formen un constructe que es desenvolupa i caracteritza en el següent capítol.

3.2. Expansió de CMMA humanes derivades de moll d'os, cartílag i greix.

Donat que l'interès final de la línia de recerca en la que s'emmarca aquest treball és el desenvolupament d'aplicacions en medicina regenerativa per a humans, i tot i que l'èmfasi d'aquest treball es centra en l'etapa preclínica, s'ha considerat important validar que les metodologies d'expansió cel·lular desenvolupades, fins ara pel model oví, són també vàlides per a l'expansió de les CMMA humanes. És important validar la tecnologia de cultiu i expansió cel·lular en aquest moment, ja que s'ha d'estar segur que es poden expandir les CMMA humanes amb els mètodes desenvolupats anteriorment en aquest treball, abans de passar a noves fases del procés de desenvolupament d'una teràpia de medicina regenerativa amb aplicacions en la salut humana.

Les línies cel·lulars escollides per a les teràpies de regeneració de cartílag, en aquest treball, són les CMMA provinents de medul·la òssia, de greix i cartílag. En l'actualitat, aquestes fonts cel·lulars ja s'estan utilitzant en les teràpies cel·lular, tal i com s'ha mostrat a les taules 1.4., 1.5. i 1.6., ja s'han comentat diferents productes en fase clínica. A l'apartat anterior s'han caracteritzat totes aquestes fonts amb el model oví, per tant en aquest apartat és vàlida el mètode d'expansió per a les CMMA humanes.

S'han realitzat experiments de cinètiques de creixement emprant cèl·lules humanes dels tres llinatges: moll de l'os, adipós i cartílag articular. Amb cadascuna de les línies cel·lulars s'ha realitzat una corba de creixement on es segueix l'evolució temporal de la densitat cel·lular, el consum de glucosa i la producció de lactat durant un cultiu. Aquest experiment s'ha realitzat utilitzant un mateix inòcul per les tres línies cel·lulars, $2.5E+03$ cèl·lules/cm². Les cèl·lules s'han cultivat en DMEM complementat amb FCS, al no disposar de sèrum autòleg del pacient o bé sèrum AB. Els resultats es mostren a les figures 3.20, 3.21 i 3.22.

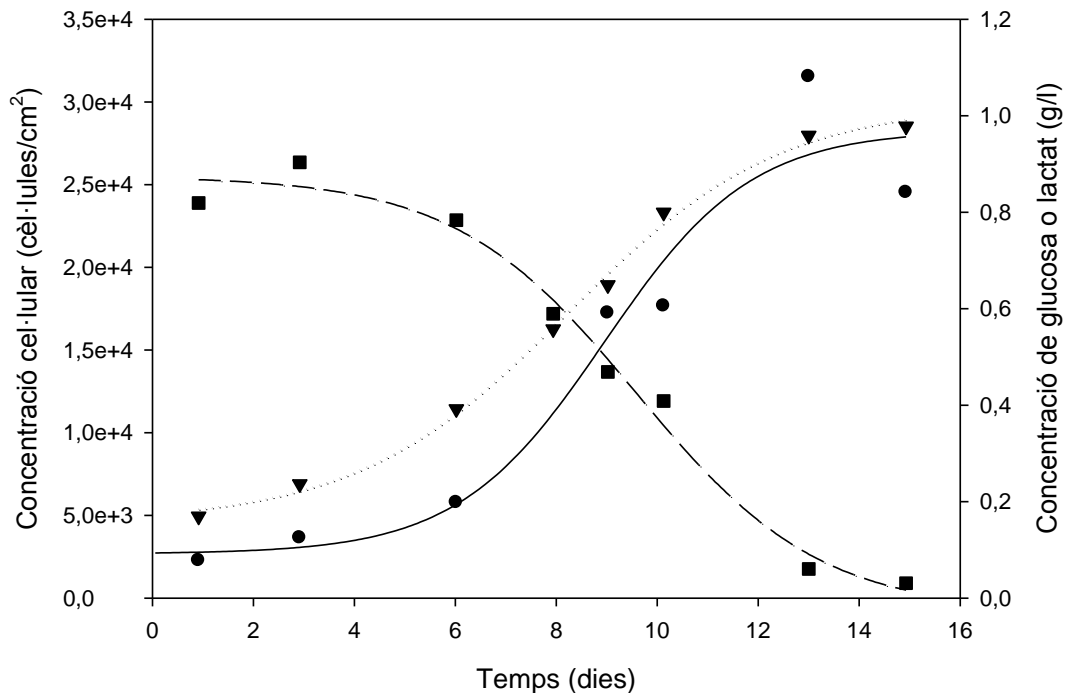


Figura 3.20. Creixement de cèl·lules mare mesenquimals humanes provinents de cartílag articular amb 2 ressembres realitzades prèviament. Inòcul $2,5E+03$ cèl·lules/cm². Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de FCS. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼).

En el cas humà, s'observen diferències considerables respecte dels aspectes que s'han comentat anteriorment en el model oví. En primer lloc cal destacar que s'han pogut expandir els tres tipus cel·lulars, arribant a densitats cel·lulars màximes al voltant de $3E+04$ cèl·lules/cm² en el cas de condrocits i CMMA provinents de moll d'os, però superiors a $5E+04$ cèl·lules/cm² en el cas de les CMMA de greix. Els valors màxims de concentració cel·lular són inferiors als trobats per a l'espècie ovina, fet que pot ser degut a la major mida de les cèl·lules. La presència de la fase de latència és evident a les figures 3.20, 3.21 i 3.22, on s'observa que les CMMA de cartílag i greix, presenten fases de latència de 4 dies, en canvi les CMMA de MO ja estan en fase exponencial el dia 2.

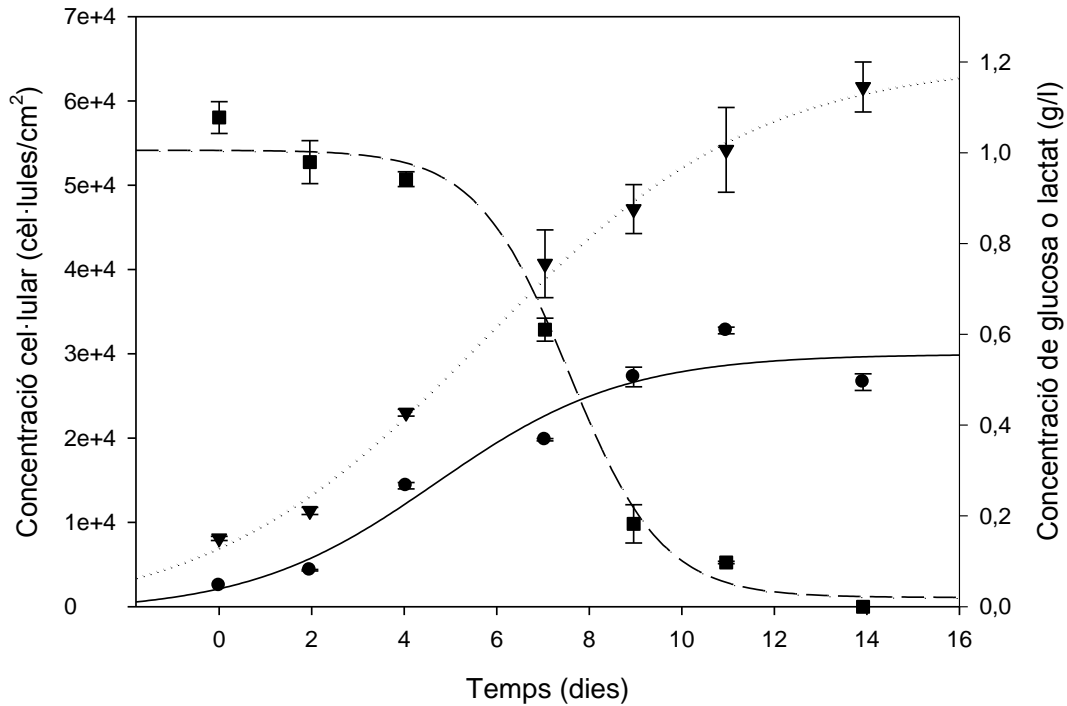


Figura 3.21. Creixement de cèl·lules mare mesenquimals humanes provinents de moll d'os amb 3 ressembres realitzades prèviament. Inòcul $2.5E+03$ cèl·lules/cm². Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de FCS. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼).

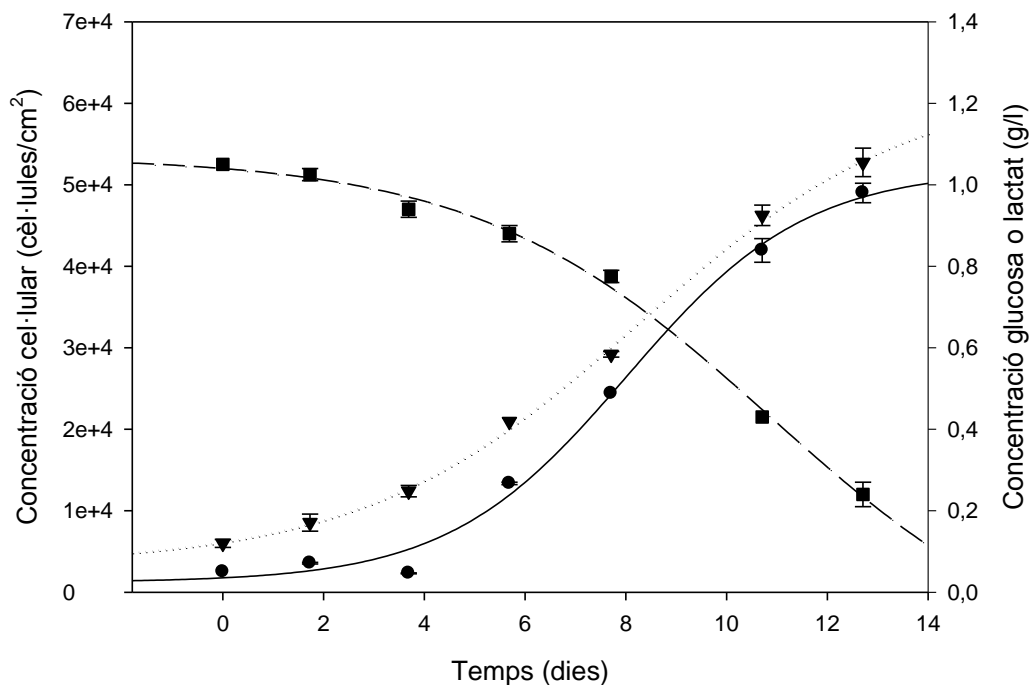


Figura 3.22. Creixement de cèl·lules mare mesenquimals humanes provinents de greix amb 4 ressembres realitzades prèviament. Inòcul $2,5E+03$ cèl·lules/cm². Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10% de FCS. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼).

A la taula 3.7. s'observa que les velocitats específiques màximes de creixement són similars per a les CMMA provinents de cartílag articular i greix humà, al voltant de $0,21 \text{ h}^{-1}$, fet que també s'ha observat al model oví en els experiments anteriors. En el cas de les CMMA provinents de moll d'os la velocitat màxima de creixement és inferior respecte a les altres dues fonts cel·lulars, amb un valor de $0,57 \text{ h}^{-1}$. Per contra, el factor d'expansió es menor en el cas de les CMMA de moll d'os. Malgrat tenir una velocitat específica de creixement més elevada no s'aconsegueixen densitats cel·lulars superior. En els casos de les CMMA provinents de cartílag articular i greix humà s'observa una relació directa que presenten el creixement i el consum de glucosa, en canvi, a la figura 3.21, s'observa un comportament diferent del metabolisme de les CMMA de moll d'os, que consumeixen una gran quantitat de glucosa en poc de temps.

Taula 3.7. Resum dels paràmetres cinètics de les CMMA. μ_{max} : velocitat específica màxima de creixement.; t_{dup} : temps de duplicació.

Tipus cel·lular	μ_{max} (dies ⁻¹)	t_{dup} (dies)	Cc final (CMMA/cm ²)	Factor expansió
CMMA de cartílag	0.21	3.38	6.05E+04	12.6
CMMA de moll d'os	0.57	1.22	2.66E+04	13.0
CMMA de greix	0,22	3.09	4.81E+04	20.0

3.3. Alternativa al sèrum com a complement per al medi de cultiu per a CMMA humanes.

La majoria dels estudis en el camp del cultiu cel·lular, a nivell de recerca bàsica, utilitzen *foetal calf sèrum* (FCS) com a complement del medi de cultiu, donat el seu ús generalitzat en el cultiu de cèl·lules animals. No obstant la regulació i les possibles complicacions per reaccions immunes adverses han fet que s'investiguin diferents alternatives com el sèrum d'origen humà autòleg, heteròleg, plasma ric en plaquetes i d'altres (pools de sèrum). La composició d'aquests complements és desconeguda, ja que no és un medi definit, però hi ha indicis experimentals on el seu ús, com la influència sobre les velocitats de creixement i la morfologia cel·lular que indiquen la seva rellevància (Wagner et al. 2007). Té interès doncs, definir medis lliures de sèrum o identificar nous sèrums que permetin estandarditzar la producció cel·lular de CMMA humanes per a passar a fases clíniques, evitant els problemes indicats. En aquest aspecte, el sèrum humà AB és un dels candidats a substituir aquests sèrums, ja que és reconegut per la seva seguretat, evitant el possible risc per infeccions o barreres reguladores per a la seva utilització en processos de

producció de teràpies per a humans (Kocaoemer et al. 2007). En el cas de les cèl·lules que s'han utilitzat en aquest treball, el model oví, el sèrum AB humà es correspon amb un anàleg que s'anomena "pool" sèric de 3-5 ovelles donants, que pot ser utilitzat per expandir qualsevol tipus cel·lular oví, independentment del seu grup sanguini, sense provocar reaccions anafilàctiques i immunològiques de rebuig.

En el camp del bioprocés aplicat a la medicina regenerativa, s'han utilitzat diferents tipus de sèrum, però a la bibliografia hi ha una mancança de dades cinètiques i fisiològiques que comparin els diferents tipus de sèrum. La majoria dels estudis en fase clínica de CMMA per a aplicacions en teràpies humans utilitzen sèrum autòleg o AB, per assegurar la qualitat del producte (Abukawa et al. 2007). Pel que fa als estudis preclínics en animals, la majoria utilitzen sèrums bovins, encara que hi ha excepcions que utilitzen sèrum autòlegs, amb la intenció de mimetitzar les condicions en les que es portarà a terme l'estudi en fases clíniques.

És aquesta l'estratègia que es seguirà en aquest treball, la utilització de sèrum autòleg o un "pool" sèric per a la realització dels estudis en cèl·lules animals en fase preclínica, assegurant així l'expansió de qualsevol línia cel·lular extreta de qualsevol animal.

En experiments preliminars, s'ha observat que no tots els sèrums autòlegs són útils per a l'aïllament i expansió de les CMMA. A la figura 3.23 es pot observar la morfologia de les CMMA cultivades amb medi suplementat amb sèrum autòleg (dreta) i sèrum "pool" (esquerra). La preparació dels sèrum es va portar a terme segons el protocol establert a l'apartat 7.3.2.

A les fotos de la dreta de la figura 3.23 les cèl·lules no responen al medi complementat amb sèrum autòleg del propi animal, no mostren la morfologia fibroblàstica, en canvi si s'observen unes cèl·lules hipertròfiques amb forma d'ous ferrats. Aquestes cèl·lules no creixen i no es poden desadherir mitjançant els mètodes tradicionals (tripsina). Per contra, el sèrum "pool", consistent en una mescla de, com a mínim 3 sèrums autòlegs, permet a les CMMA adquirir la forma fibroblàstica i una proliferació normal. A les fotos de l'esquerra s'observen unes cèl·lules fibroblàstiques que en 4 dies mostren una proliferació evident, remarcant la importància del sèrum en l'aïllament i

expansió de les CMMA, poden així expandir-les independentment del tipus o font de cèl·lules, del seu grup sanguini, sense provocar reaccions anafilàctiques i immunològiques de rebuig.

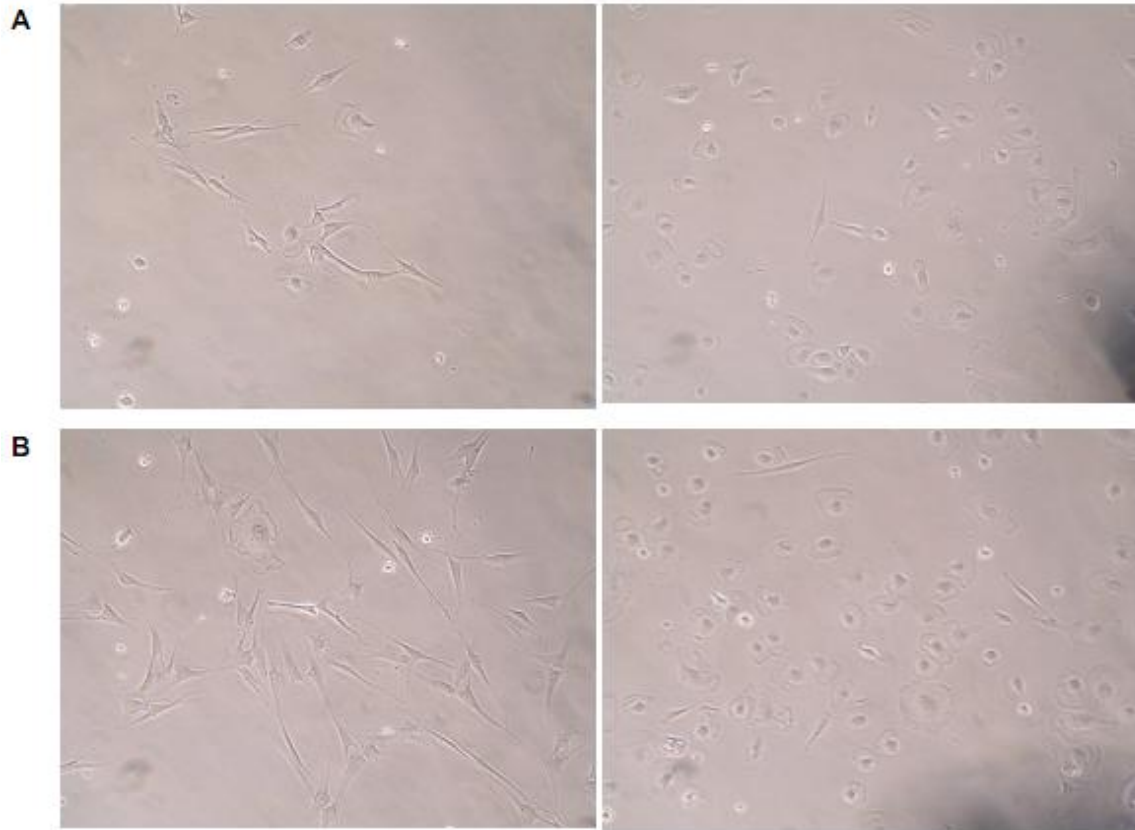


Figura 3.23. Aspecte del cultiu de cèl·lules mare mesenquimals provinents de moll d'os oví. Dia 1 (A) i Dia 4 (B) post-rentat. En els dos casos, a l'esquerra es mostra el cultiu crescut amb el medi complementat amb "pool" sèric i a la dreta, amb sèrum autòleg.

3.3.1. Estudi comparatiu de la utilització de sèrum FCS i AB en l'expansió de CMMA derivades de cartílag articular humà.

Per tal de provar que el sèrum AB humà és realment una alternativa al FCS es plantejaren experiments de creixement. En aquest apartat s'utilitzen CMMA procedents de cartílag humà perquè és el tipus cel·lular del que disposa més experiència el grup d'investigació. Per investigar l'efecte del sèrum sobre l'expansió d'aquestes cèl·lules en plàstic adherent, s'han realitzats diferents creixements en paral·lel, com s'ha fet en els apartats anteriors. Els principals paràmetres

de creixement i metabòlics han estat calculats per conèixer si el sèrum AB és adient per a l'expansió, en tant en quant manté una velocitat de creixement similar o superior a les obtingudes amb el suplement FCS, així com també manté les propietats de diferenciació cap a diferents llinatges cel·lulars.

A la figura 3.24, s'observa un exemple de creixement típic de CMMA provinents de cartílag articular humà en medi DMEM suplementat amb sèrum FCS al 10%, on es pot observar que el consum de la glucosa està directament relacionat amb el creixement cel·lular.

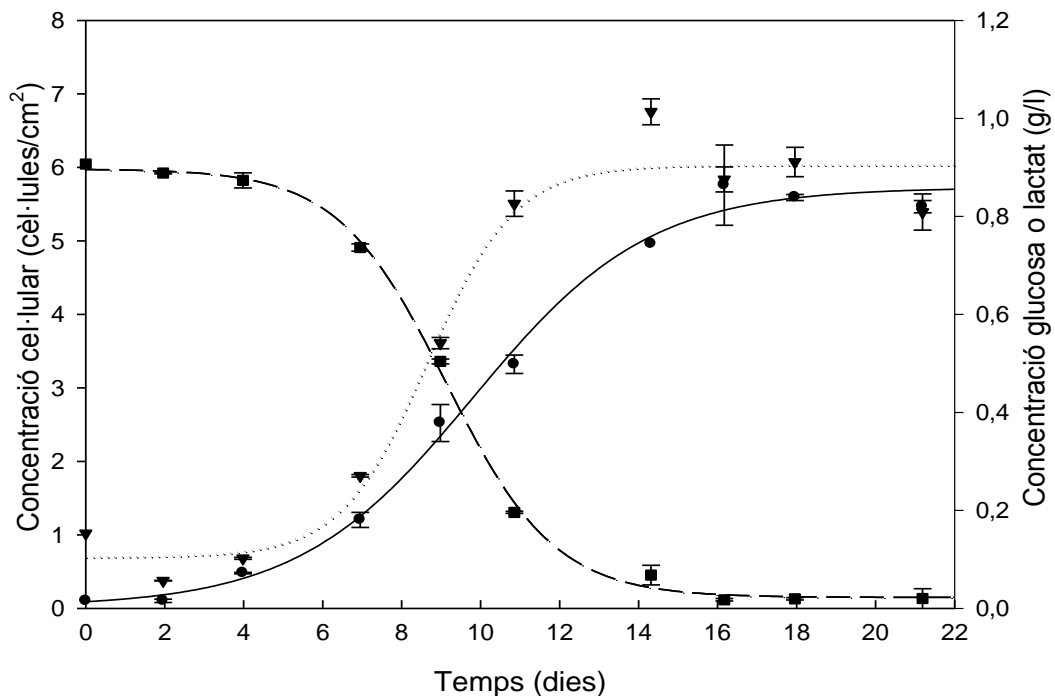


Figura 3.24. Creixement de cèl·lules mare mesenquimals humanes provinents de cartílag articular amb 2 ressebres realitzades prèviament. Inòcul $2,5E+03$ cèl·lules/cm². Medi de cultiu DMEM suplementat amb 10 % de FCS. Condicions de cultiu: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C. Cèl·lules (●), glucosa (■) i lactat (▼).

En aquest cas, s'observa una fase de latència d'una durada aproximada de 4 dies i una fase exponencial de 6 dies. Cap al dia 10 de cultiu, la glucosa s'esgota, coincidint amb l'entrada en fase estacionària del cultiu, on el cultiu es troba amb una confluència superior al 80% (figura 3.25-B). La concentració cel·lular màxima del cultiu és de

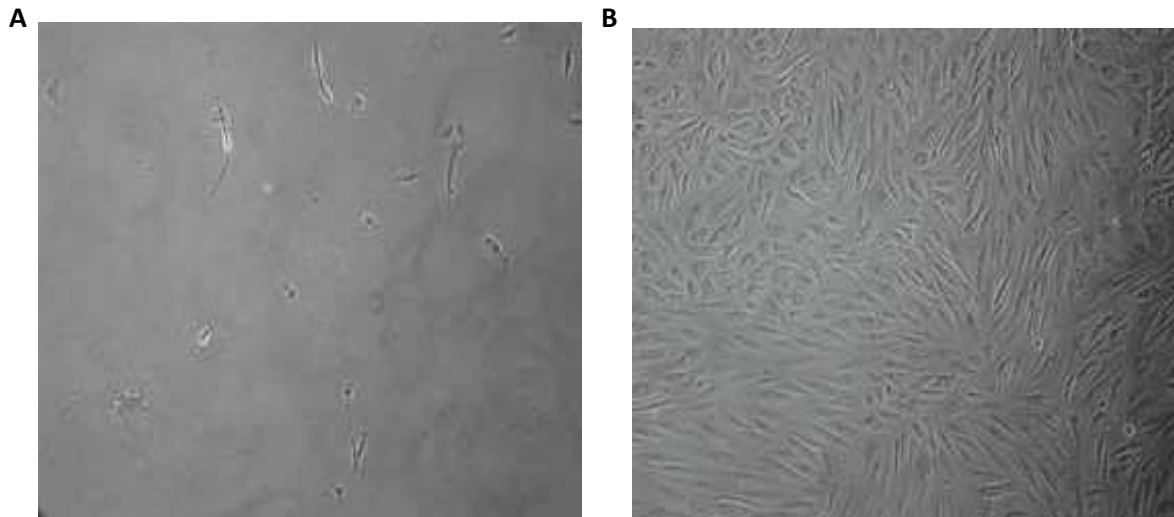


Figura 3.25 CMMA de cartílag articular. (A) Primers dies de cultiu sembrat a 1000 cèl·lules/cm² (B) Final del cultiu en confluència.

A la figura 3.25 es mostren les imatges de l'observació microscòpica de les CMMA provinents de cartílag articular humà durant l'expansió cel·lular, on s'observen canvis en la morfologia cel·lular. A l'esquerra tenim el cultiu inicial, on s'observa una morfologia fibroblàstica allargada (figura 3.25.A), passant al final del cultiu a adquirir una morfologia més compactada (figura 3.25.B). S'observa una hipotròfia de les cèl·lules que es distribueixen al voltant de tota la superfície de cultiu. L'estudi en medi sense FCS, però amb sèrum AB s'ha realitzat a quatre densitats diferents de sembra de CMMA.

A la figura 3.26, es representa el creixement de les cèl·lules amb cada suplement, ja sigui FCS o AB. Els cultius complementats amb suplement AB presenten un temps de duplicació menor, en totes les densitats de sembra assajades en aquest experiment, en comparació amb el cultius complementats amb sèrum FCS. Aquest fet ens mostra que no només l'expansió clínica serà més segura per utilitzar sèrum AB, sinó que es podrien escurçar els temps d'expansió. La reducció en el temps d'expansió presenta dues avantatges: una és la reducció en el cost de la teràpia, i l'altra és la rapidesa a la que es podria fer un possible trasplantament autòleg de CMMA, que en determinades malalties (com el càncer o grans cremats) pot arribar a ser un factor determinant.

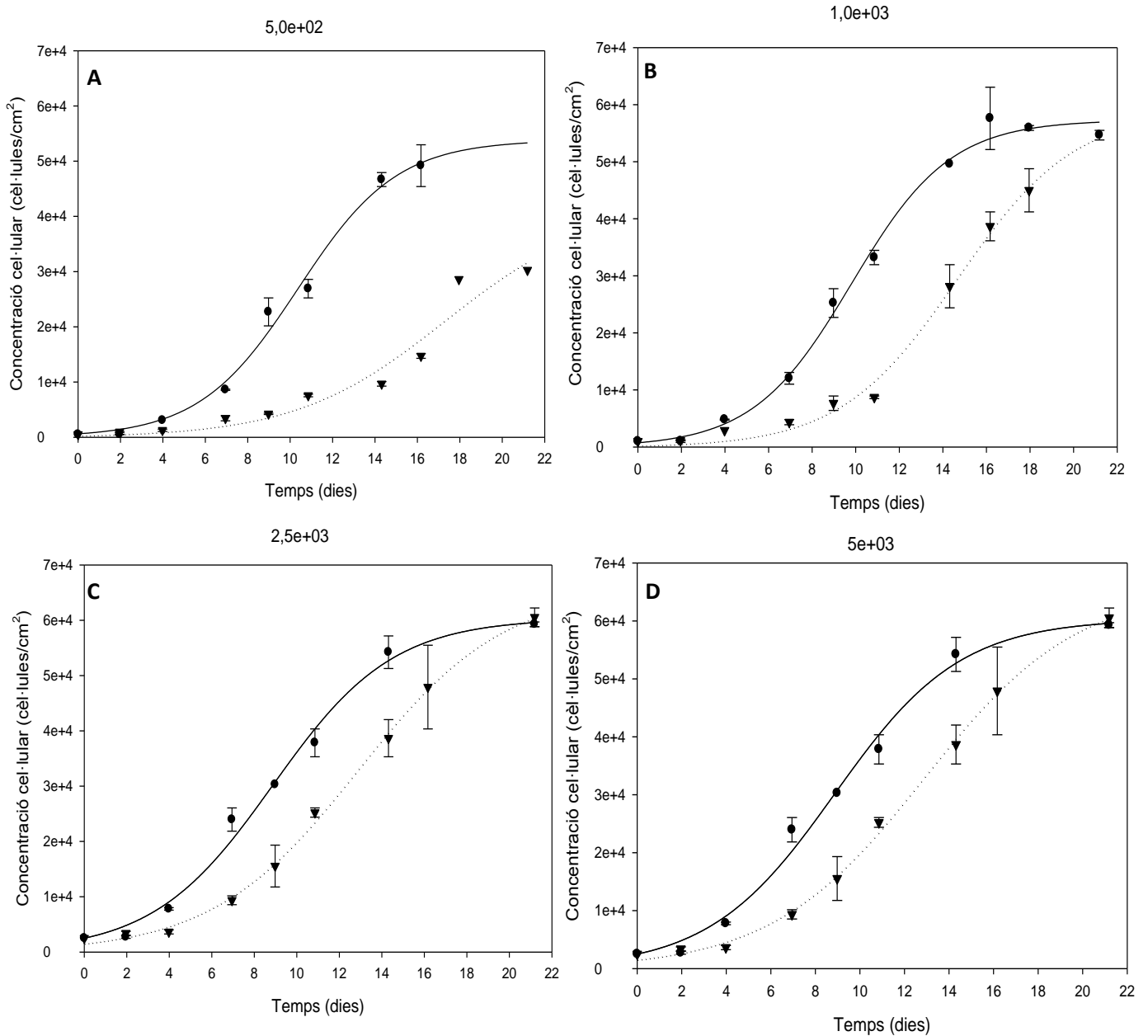


Figura 3.26. Comparació del creixement cel·lular de CMMA provinents de cartílag articular humà en medi DMEM suplementats amb 10% de sèrum AB (●) o 10% de FCS (▼). Densitats de sembra: (A) 5E+02; (B) 1E+03; (C) 2.5E+03; (D) 5E+03.

La densitat de sembra inicial presenta un efecte directe sobre el creixement cel·lular i determina quina confluència es pot arribar a aconseguir en un creixement sense limitacions de nutrients. Aquest efecte es pot veure clarament a la figura 3.26 on s'observa, com ja s'ha comentat en apartats anteriors, relació directa entre la densitat de sembra baixa i l'allargament de la fase de latència i la concentració cel·lular final menor. Aquest fet relaciona la densitat de sembra amb la velocitat específica de creixement. Com es pot veure a la taula 3.8, hi ha una correlació inversa entre velocitat específica màxima de creixement (μ_{max}) i la densitat de sembra quan s'utilitza com a

suplement de medi el AB. El resultat promig de velocitat específica de creixement correspon a la densitat de sembra $5.0E+02$ cèl·lules/cm², sent en qualsevol cas, menor comparada amb la obtinguda amb el sèrum AB. La correlació entre la velocitat específica de creixement i la densitat de sembra no s'observa en el cas del suplement FCS.

Taula 3.8. Paràmetres cinètics de creixement en l'expansió de CMMA provinents de cartílag articular humà cultivats amb medis suplementats amb sèrum AB o FCS. μ_{\max} : velocitat específica de creixement.; t_d : temps de duplicació; q_{gluc} : Consum específic de glucosa; q_{lac} : Producció específica d'àcid làctic.

Suplement	Inòcul (cell/cm ²)	μ_{\max} (hores ⁻¹)	t_d (dies)	q_{gluc} (($\mu\text{mol}/(10^6\text{cells}\cdot\text{dia})$))	q_{lac} (($\mu\text{mol}/(10^6\text{cells}\cdot\text{dia})$))	Factor d'expansió
AB	5.00E+02	0.51	1.35	6.76	15,14	6,65
	1.00E+03	0.4	1.73	7.07	16,26	5,89
	2.50E+03	0.35	2.00	4.85	8,53	4,57
	5.00E+03	0.24	2.88	4.94	10,72	3,73
FCS	5.00E+02	0.23	3.01	4.53	20,65	5,74
	1.00E+03	0.25	2.78	7.47	29,09	5,49
	2.50E+03	0.28	2.48	5.96	12,13	4,6
	5.00E+03	0.18	3.76	4.55	9,55	3,94

És destacable la duplicació de la velocitat específica màxima de creixement en el cas de les CMMA cultivades amb complement del cultiu AB, en canvi en el cas del complement FCS la diferència no és tan gran. S'observa una velocitat específica de creixement i un factor d'expansió major a densitats baixes, però una concentració cel·lular màxima menor per problemes d'esgotament de nutrients essencials com la glucosa. Pel que fa als consums metabòlics, no es troba cap relació directa entre la densitat de sembra, però sí una tendència per les densitats baixes a consumir més glucosa en el cas dels medis suplementats amb AB. Aquestes dades presenten certa controvèrsia sobre la capacitat de diferenciació d'aquestes cèl·lules, ja que es postula una disminució de la capacitat de diferenciació quan es sembra a densitat baixes (Hedbom et al. 2001). En un altre estudi es demostra el contrari, una velocitat específica de creixement superior a densitats baixes i el manteniment de la capacitat de diferenciació, tal i com també afirmen certs autors (Mandl et al. 2004). En aquest treball s'han realitzat les diferenciacions de tots els inòculs i han resultat positives per a la diferenciació condrogènica, adipogènica i osteogènica. Per tant, encara que es sembri a densitats baixes, és manté la capacitat de diferenciació de les CMMA.

En aquest apartat s'ha demostrat que la utilització de sèrums alternatius al FCS és possible, ja que tant el sèrum autòleg en model oví com l'AB en humà, han mostrat resultats igual o millors en l'aïllament i l'expansió de les CMMA. Diferents autors recomanen la utilització d'aquests sèrums per al desenvolupament de teràpies en humans (Kocaoemer et al. 2007; Schallmoser et al. 2007), evitant així els riscos ja comentats sobre la utilització de sèrums derivats d'animals. Es més, amb aquesta estratègia es caracteritza dels inicis de la investigació en preclínica les CMMA i les seves característiques (creixement, diferenciació, secreció) per a una possible aplicació en teràpia humana.

3.4. Bibliografia

- Abercrombie, M., et al. (1962). "The surface properties of cancer cells: a review." *Cancer Res.* **22**: 525-548.
- Abukawa, H., et al. (2007). "Effects on Porcine Mesenchymal Stem Cells When Cultured in Autologous Versus Fetal Bovine Serum." *Journal of Oral Tissue Engineering* **5**(1): 23-34.
- Bernardo, M. E., et al. (2007). "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms." *Cancer research* **67**(19): 9142.
- Bourzac, C., et al. (2010). "Isolation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols." *Equine Veterinary Journal* **42**(6): 519-527.
- Campagnoli, C., et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." *Blood* **98**(8): 2396.
- Campmajó, C., et al. (1994). "Determination of ammonium and L-glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis." *Cytotechnology* **14**(3): 177-182.
- Caplan, A. (2005). "Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics." *Tissue Engineering* **11**(7-8): 1198-1211.
- Caplan, A., et al. (2008). "MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue." *Tissue Engineering Part A* **15**(2): 221-229.
- Carrancio, S., et al. (2008). "Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification." *Experimental hematology* **36**(8): 1014-1021.
- Colter, D., et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(7): 3213.
- de la Fuente, R., et al. (2004). "Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells." *Experimental cell research* **297**(2): 313-328.
- De Tremblay, M., et al. (1993). "Fed-batch culture of hybridoma cells: Comparison of optimal control approach and closed loop strategies." *Bioprocess Engineering* **9**(1): 13-21.
- De Ugarte, D., et al. (2003). "Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow." *Immunology letters* **89**(2-3): 267-270.
- Deng, Y., et al. (2002). "Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds." *Biomaterials* **23**(20): 4049-4056.
- Dominici, M., et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-317.
- Dudas, J., et al. (2006). "The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects." *Annals of plastic surgery* **56**(5): 543.
- Friedenstein, A., et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." *J Embryol Exp Morphol* **16**(3): 381-90.
- Garcia-Olmo, D., et al. (2009). "Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial." *Diseases of the Colon & Rectum* **52**(1): 79.
- Gimble, J., et al. (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." *Cytotherapy* **5**(5): 362-369.
- Giordano, A., et al. (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." *Journal of Cellular Physiology* **211**(1): 27-35.
- Guo, X., et al. (2004). "Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep." *Tissue Engineering* **10**(11-12): 1830-1840.
- Haleem, A. M. (2009). from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00891501?term=mesenchymal+stem+cells&rank=28>.
- Hedbom, E., et al. (2001). "Culture of articular chondrocytes in alginate gel--a means to generate cartilage-like implantable tissue." *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society* **9**: S123.
- Horwitz, E., et al. (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **7**: 393-5.
- Horwitz, E., et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." *Blood* **97**(5): 1227.

- Hu, W. S., et al. (1985). "A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers." *Biotechnology and Bioengineering* **27**(5): 585-595.
- Huang, J., et al. (2002). "Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells." *Plastic and reconstructive surgery* **109**(3): 1033.
- Huang, J., et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Engineering* **7**(2).
- Hung, S., et al. (2007). "Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis." *Stem cells* **25**(9): 2363-2370.
- Kocaoemer, A., et al. (2007). "Human AB Serum and Thrombin Activated Platelet Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue." *Stem cells* **25**(5): 1270-1278.
- Kusuzaki, K., et al. (2001). "DNA cytofluorometric analysis of chondrocytes in human articular cartilages under normal aging or arthritic conditions." *Osteoarthritis and Cartilage* **9**(7): 664-670.
- Kuznetsov, S., et al. (1997). "Single Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo." *Journal of bone and mineral research* **12**(9): 1335-1347.
- Le Blanc, K., et al. (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." *The Lancet* **363**(9419): 1439-1441.
- Lee, R., et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(46): 17438.
- Levin, M. (2002). *Pharmaceutical Process Scale-up*.
- Mandl, E., et al. (2004). "Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity." *Tissue Engineering* **10**(1-2): 109-118.
- McCarty, R., et al. (2009). "Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells." *Journal of Cellular Physiology* **219**(2): 324-333.
- Mrugala, D., et al. (2008). "Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model." *British Medical Journal* **67**(3): 288.
- Murphy, J., et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." *Arthritis & Rheumatism* **48**(12): 3464-3474.
- Musina, R., et al. (2005). "Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues." *Bulletin of experimental biology and medicine* **139**(4): 504-509.
- Neupane, M., et al. (2008). "Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells." *Tissue Engineering Part A* **14**(6): 1007-1015.
- Niemeyer, P., et al. (2007). "Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro." *Tissue Engineering* **13**(1): 111-121.
- Ortiz, L., et al. (2007). "Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(26): 11002.
- Peris, D. (2007). "Caracterització de cèl·lules mare adultes en cultius en monocapa i matrius tridimensionals. Master-Tesis."
- Phinney, D., et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views." *Stem cells* **25**(11): 2896-2902.
- Pittenger, M., et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143.
- Rentsch, C., et al. (2010). "Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*: 1-11.
- Rubio, D., et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." *Cancer research* **65**(8): 3035.
- Sand, T., et al. (1977). "Metabolic crowding effect in suspension of cultured lymphocytes." *Blood* **50**(2): 337-346.
- Sarro, E. (2010). *Sistemes de monitoratge per a cultius de cèl·lules animals adherents. Desenvolupament i aplicacions en models cel·lulars i tissulars.*, UAB.

- Schäffler, A., et al. (2007). "Concise Review: Adipose Tissue Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell Based Therapies." Stem cells **25**(4): 818-827.
- Schallmoser, K., et al. (2007). "Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells." Transfusion **47**(8): 1436-1446.
- Sekiya, I., et al. (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality." Stem Cells **20**(6): 530-541.
- Song, L., et al. (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." The FASEB Journal: 03.
- Tallheden, T., et al. (2003). "Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 93.
- Toma, J., et al. (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." Nature Cell Biology **3**(9): 778-784.
- Tuli, R., et al. (2004). "Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct." Tissue Engineering **10**(7-8): 1169-1179.
- Wagner, W., et al. (2007). "Mesenchymal stem cell preparations—comparing apples and oranges." Stem Cell Reviews and Reports **3**(4): 239-248.
- Wang, Y., et al. (2006). "Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes." Biomaterials **27**(25): 4434-4442.
- Wu, Y., et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem cells **25**(10): 2648-2659.
- Young, H., et al. (1995). "Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs." American Journal of Anatomy **202**(2): 137-144.
- Young, H., et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." The Anatomical Record **264**(1): 51-62.

CAPÍTOL 4

ESTUDI DE MATRIUS, COLONITZACIÓ I APLICACIÓ BIOMÈDICA

El plantejament d'aquest treball està basat en la utilització de dos components, per una banda les cèl·lules, caracteritzades en el capítol 3, i d'altra banda els biopolímers. Així doncs, es procedeix a l'estudi de les biomatrius, de PLGA, escollides en experiments previs portats a terme pel grup d'investigació GECIT (Sarro 2010).

En la primera part del capítol es caracteritza el polímer, la seva porositat, la seva estructura microscòpica, la cinètica de colonització de les CMMA, la distribució cel·lular a dintre de la biomatriu i la seva capacitat de diferenciació. En la segona part del capítol es realitza un experiment pilot amb el model animal escollit, l'ovella. En aquest experiment pilot es tracta de generar una lesió crítica que permeti avaluar la capacitat de regeneració dels constructes cel·lulars que s'han dissenyat per a la regeneració de lesions osteocondrals i posar a punt tota la metodologia i protocols quirúrgics necessaris. Tanmateix, s'establiran les bases per a l'avaluació en futurs experiments en animals models, tant a nivell macroscòpic com microscòpic i del diagnòstic no invasiu per imatge.

4.1. Preparació de biopolímers

Existeixen diferents protocols de fabricació i de presentació de la biomatriu de PLGA. Cadascuna de les seves aplicacions en la regeneració d'un teixit determinat requereix una forma i una estructura característica, i en gran part, aquesta ve determinada de la forma de fabricar la matriu, és a dir, de forma que es poden fabricar estructures d'esponges (Chen et al. 1999), malles trenades (Terada et al. 2000), malles no trenades (Wu et al. 2007), partícules injectables (Kang et al. 2005) o modelats amb *rapid-prototyping* (Yu et al. 2008) entre d'altres.

Fins ara, una de les estructures més utilitzats en aplicacions de medicina regenerativa per a teixits tous han estat les malles no trenades de PGA, PLA o PLGA, per la seva alta porositat i la interconnectivitat que presenten en la estructura porosa (Wang et al. 2003). En canvi, en el present treball s'ha escollit una esponja porosa, on l'agent porògen és el clorur sòdic.

Així doncs es posa en marxa un mètode per a fabricar biomatrius cilíndrics de PLGA 50:50 amb una porositat de diàmetre variable entre 0,074 i 0,350 mm, ja que en treballs anteriors del grup d'investigació s'ha demostrat que aquesta proporció de PLA i PGA (50:50) és la més adient per a la colonització de les matrius (Caminal 2007). El mètode per a fabricar les matrius és una variant de l'utilitzat per Lin i col·laboradors (Lin et al. 2002). A la taula 7.8. s'esquemmatitza el procés, detallant pas a pas el aspectes més rellevants (veure apartat 7.7. de Materials i Mètodes). Breument, es dissol el PLGA amb cloroform, per poder barrejar-lo amb el porògen i donar la forma al polímer. Aquest polímer es deixa assecar i s'extreu el porògen deixant-lo amb una gran quantitat d'aigua. Un cop s'asseca el polímer, es congela i posteriorment es liofilitza. La forma final cilíndrica s'obté amb un "sacabocados" del diàmetre corresponent a un mil·límetre superior a la lesió a regenerar, perquè s'assumeix que la impactació del polímer en la lesió osteocondral, provoca una compressió d'aproximadament un mil·límetre de diàmetre de la matriu. Les mides del cilindre s'estableixen en 10 mm d'altura i 4 mm de diàmetre, resultant un volum del cilindre de 0,5 cm³.

El mètode per generar l'estructura porosa és el filtrat de sal. Amb el tamisat o filtrat del clorur sòdic s'aconsegueixen unes partícules del rang de la mida que es desitja, tal i com es pot veure a l'esquema de la figura 4.1., les partícules retingudes en un compartiment entre dos filtres seran les que es consideren dintre d'un rang determinat. La figura 4.1. és una representació esquemàtica del que passa a dintre del tamissador, on les partícules que es troben a la part dreta

de la figura representen l'agent porògen sense tamissar, un cop van passant per els diferents filtres, es van eliminant les partícules de major mida que no interessen.

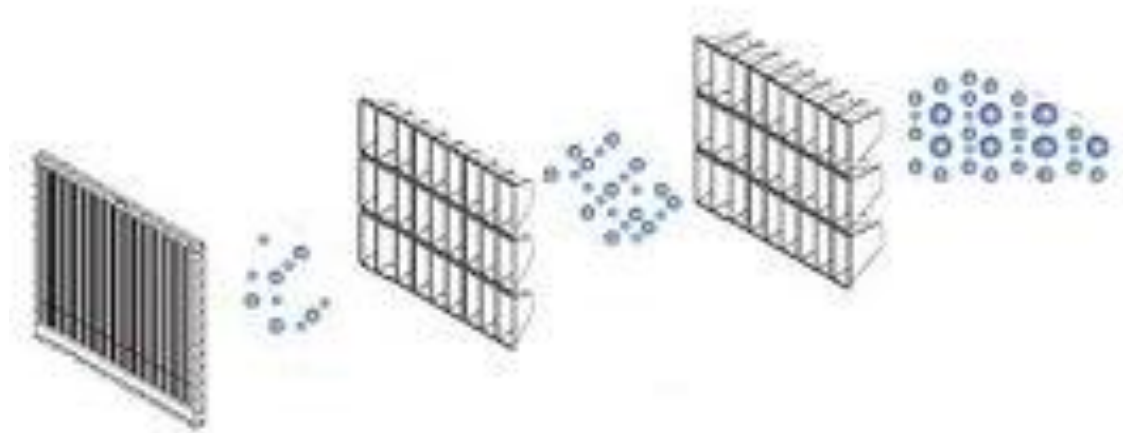


Figura 4.1. Les partícules de clorur sòdic es van seleccionant per els filtres que tenen una mida determinada.

És a dir, si es vol seleccionar per exemple una mida de porus entre 0,100mm i 0,200mm, el filtre del mig de la figura 4.1 ha de ser de 0,200mm i el de l'esquerra ha de ser de 0,100mm, així totes les partícules de porògen amb una mida entre 0,100 i 0,200mm quedaran retingudes entre aquests dos filtres i es podran recollir fàcilment.

Tal i com s'ha comentat a la introducció, la porositat i la interconnectivitat són elements claus de l'estructura d'aquests materials. Amb aquest mètode del filtrat es pot controlar la mida del porus d'una manera simple durant el procés de producció, ajustant les quantitats de porògen, en aquest cas el clorur sòdic. La porositat i la interconnectivitat han de ser altes al polímer que es fabrica, permetent així una bona difusió dels nutrients a través del constructe i una eficiència alta en la colonització cel·lular.

El procés s'estableix per a la fabricació de cilindres de PLGA amb porositats diferents. El comportament de la matriu pot estar afectat per diferents element com el porògen, però aquest és eliminat durant el procés per un mètode molt senzill, la dissolució en aigua destil·lada. Un altre procés que pot afectar la composició o l'estructura del biopolímer és el mètode d'esterilització. Hi ha diferents mètodes d'esterilització, en l'àmbit de la recerca bàsica el més utilitzat és el rentat amb etanol al 70%. Existeixen altres mètodes com l'esterilització per òxid d'etilé o la radiació

gamma, ambdós amb una eficiència d'esterilització del 100%. En el cas de l'òxid d'etilè s'ha vist que hi ha una pèrdua del 50% del volum, en canvi a la radiació gamma no s'observa aquest efecte (Holy et al. 2001). En aquest treball, s'escull la radiació gamma com a mètode d'esterilització per l'absència de pèrdua de volum i la conservació de les propietats de la matriu, a més de la disponibilitat d'una font de radiació gamma.

Així doncs, un cop s'ha aconseguit establir la metodologia de preparació de la matriu, es fa un pas endavant i s'incorpora l'altre component essencial en el constructe que s'està desenvolupant per a la regeneració de les lesions osteocondrals, el component cel·lular.

4.2. Colonització de biopolímers amb CMMA provinents de cartílag articular

Per a la formació d'un teixit, és essencial que l'estructura de la matriu faciliti la sembra de cèl·lules i promogui la proliferació cel·lular i la secreció d'una matriu extracel·lular (ME) (Woodfield et al 2002). En el cas de la regeneració de cartílag hialí, és important que la matriu presenti una densitat alta i que les cèl·lules es distribueixin uniformement per totes les zones de la matriu, per tal de promoure la condrogènesis i prevenir la formació de teixit fibrós (Freed i Novakovic Vunjak-1998, i Li et al 2001).

La taula 4.1 resumeix els diferents mètodes de colonització o sembra que s'han utilitzat en el camp de l'enginyeria tissular i la medicina regenerativa aplicada al cartílag. Entre d'altres, es troben els flascons agitats (Freed et al 1994a), l'encapsulació de les cèl·lules en una matriu macromolecular com és l'alginat (Marijnissen et al 2002) o l'agitació dinàmica en plaques de cultiu o recipients estèril com els tubs falcons amb un agitador orbital (Brown et al 2000).

A la bibliografia hi ha pocs exemples que comparin els mètodes de sembra ja que cada laboratori té el seu mètode estandarditzat per a la recerca bàsica. Llavors, en principi, els principals factors que afecten a la colonització són el mètode de sembra o colonització, la durada de la colonització, el tipus de polímer i les característiques d'aquest.

El polímer que s'utilitza és el mateix en tots els experiments, només modificant la variable de la porositat, ja que s'estudien diferents rangs de porositat per veure l'efecte sobre la distribució cel·lular a tota la matriu.

Taula 4.1. Principals mètodes de colonització utilitzats en la recerca bàsica.

Mètode de sembra	Tipus de polímer	Cèl·lules	Referència
Sistema no agitat	Malla de PGA no trenada	Condròcits auriculars porcins	(Brown et al. 2000)
Encapsulació amb alginat	Malla de PLLA no trenada	Condròcits articulars bovins	(Marijnissen et al. 2000)
Perfusió	Malla de hyaluronan no trenada	Condròcits articulars bovins	(Wendt et al. 2003)
Flascó agitat	Malla de PGA no trenada	Condròcits articulars bovins	(Vunjak Novakovic et al. 1998)
Cultiu en bioreactor	Malla de PLGA no trenada	Condròcits articulars bovins	(Moran et al. 2003)

Es realitzen experiments de colonització emprant matrius amb porositats diferents i s'estudia la cinètica del procés de colonització en sistemes no agitats. Les mides de porus utilitzades i les propietats que aquests porus confereixen al polímer es mostren a la taula 4.2. En aquestes primeres proves s'utilitza el PLGA 50:50 tipus 2 ja que es considera que és el que presenta una combinació de resistència mecànica i difusió de nutrients més equilibrada. Més endavant s'utilitzen biomatrius amb altres porus.

Taula 4.2. Relació de la mida de l'agent porògen i les propietats que aquesta mida de porus confereix. ↑: Alta, ↑↑: molt alta, ↓: baixa, ↓↓: molt baixa.

Tipus de porus	Mida NaCl	Propietats
PLGA tipus 1	0.147- 0.074 mm	↑↑resistència mecànica ↓↓difusió nutrients
PLGA tipus 2	50% → 0.147- 0.074 mm 50% → 0.3-0.177 mm	↑resistència mecànica ↑difusió nutrients
PLGA tipus 3	0.3-0.177 mm	↓resistència mecànica ↑difusió nutrients
PLGA tipus 4	0.3-0.5 mm	↓↓ resistència mecànica ↑↑ difusió nutrients

S'han dissenyat 3 estratègies de cultiu no agitat que permeten a les cèl·lules adherir-se a la matriu sense haver-les de tenir en cultiu agitat. Aquests sistemes tenen en comú que fan passar forçadament les cèl·lules per dins de la matriu. En el primer de tots, es col·loca la matriu de PLGA dins d'un porta filtres (figura 4.2-B), utilitzant discs de tefló per tal que no es mogui. Es prepara una

suspensió de $1E+06$ CMMA en 20 mL i es carrega amb una xeringa amb la que es fa passar lentament a través del portafiltrares.

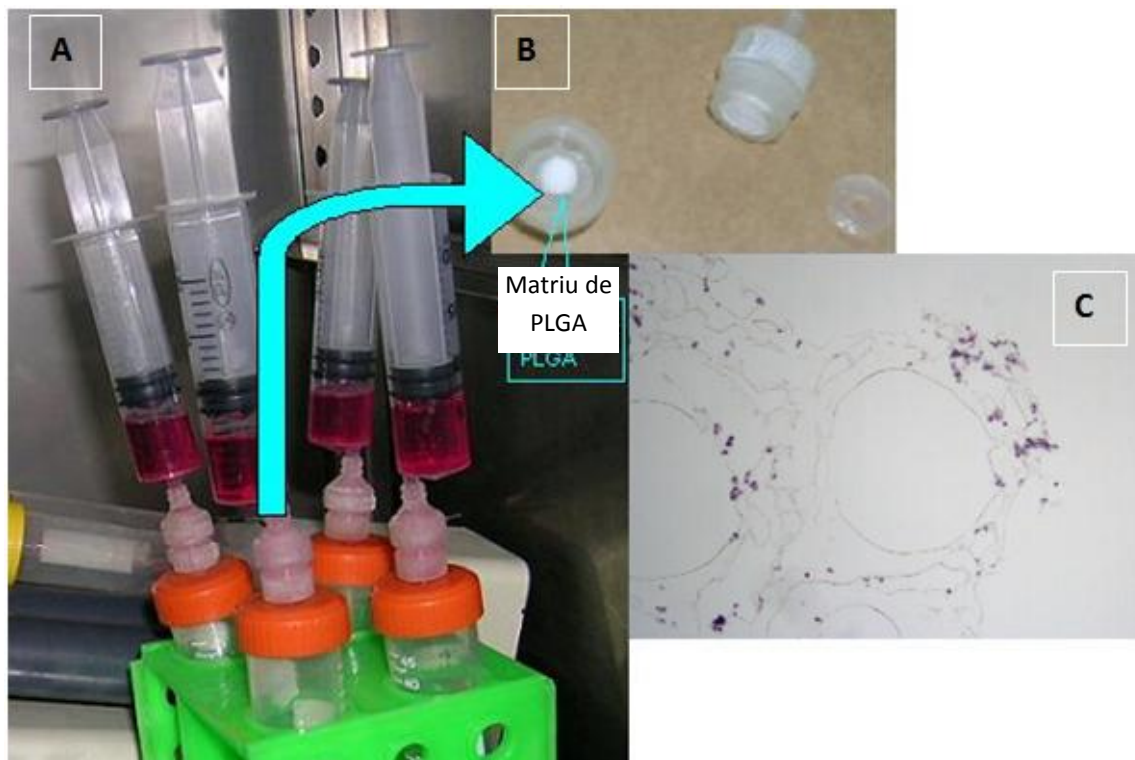


Figura 4.2. Colonització no agitada amb flux forçat per pressió: muntatge amb filtre, i xeringa amb cèl·lules que van passant per dins la matriu i s'hi van dipositant. CMMA humanes de cartilag articular: Inòcul $1E+06$ CMMA totals. A i B: muntatge de la colonització. C: Histologia de la matriu de PLGA (tinció Hematoxilina - Eosina) després de colonitzar.

A la figura 4.2-C, s'observa que alguna cèl·lula ha entrat dins la matriu, però la major part se situen a la perifèria, al voltant de les grans rodones que representen els porus on no s'observen cèl·lules a l'interior, així doncs no es veu una distribució uniforme i homogènia a totes les zones de la matriu.

En el segon mètode no agitat, la matriu de PLGA es col·loca dins del bisturí cilíndric amb el qual ha estat tallada. Per un extrem del bisturí es connecta una xeringa mitjançant tubs de silicona. Es preparen 50 μ l de medi amb $1E+06$ CMMA. El medi amb les cèl·lules es posa a sobre la matriu i amb la xeringa es genera una pressió negativa que permet que les cèl·lules entrin a la matriu. Es deixa 3 – 4 h a l'incubador de CO_2 per permetre l'adhesió de les cèl·lules. En el muntatge de la xeringa, tal i com s'observa a la figura 4.3-C, també s'ha aconseguit que entressin cèl·lules, però com en el cas del primer muntatge hi ha poca densitat cel·lular i les cèl·lules no

formen cap tipus d'agrupació. En tots dos casos es suposa que l'estrès mecànic que es genera a l'hora de fer entrar les cèl·lules de manera forçada, fa que aquestes pateixin algun canvi que no els permeti unir-se a la matriu.

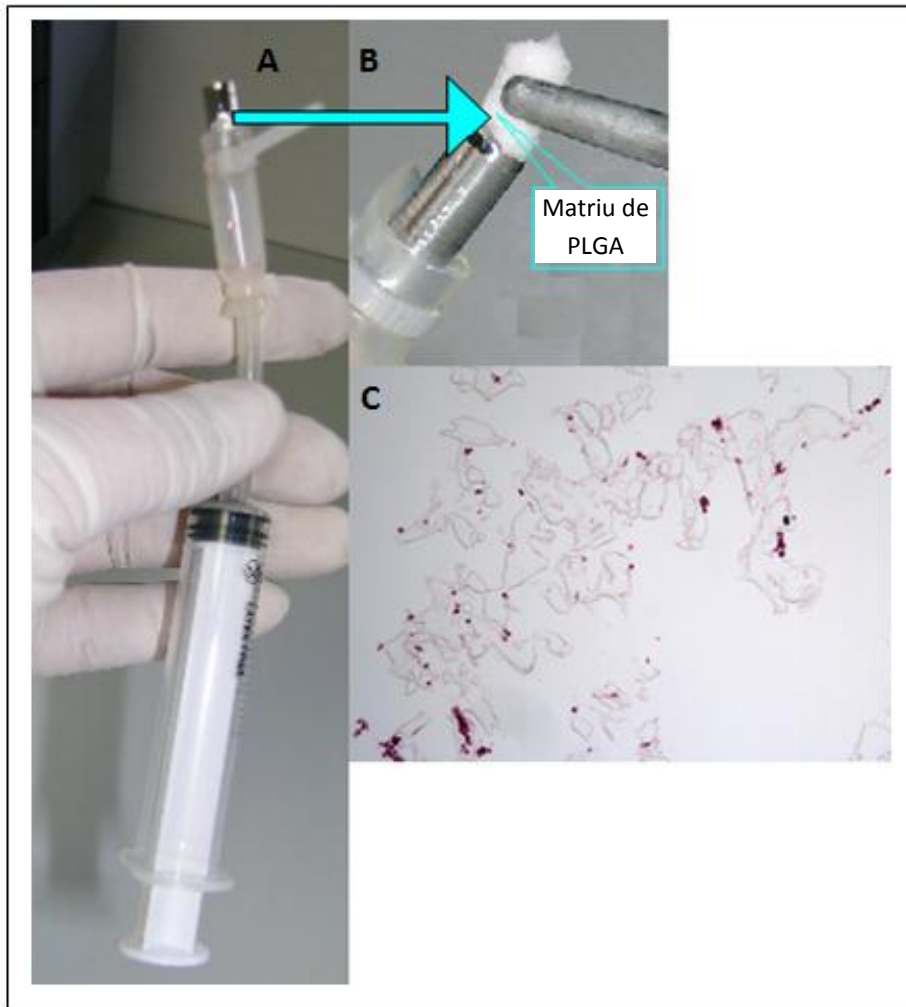


Figura 4.3. Colonització no agitada amb un flux forçat per succió: muntatge amb la matriu en un cilindre i la xeringa que aspira les cèl·lules. CMMA humanes de cartílag articular: Inòcul $1E+06$ cèl·lules totals. A i B: muntatge de la colonització. C: Histologia de la matriu de PLGA (tinció Hematoxilina – Eosina) després de colonitzar.

El tercer mètode de colonització no agitada consisteix en deixar la matriu de PLGA en un pou d'una placa de 96 pous (figura 4.4). Es preparen $50 \mu\text{L}$ de medi amb $1E+06$ CMMA i es dispositen sobre la matriu, incubant la mescla a l'incubador de CO_2 durant 3–4 hores. En aquest cas, s'intenta disminuir la pressió exercida. No obstant, en aquest cas les cèl·lules no entren dins de la matriu tal com s'observa a la histologia (figura 4.4-D) per tant no és un bon mètode per colonitzar-la.

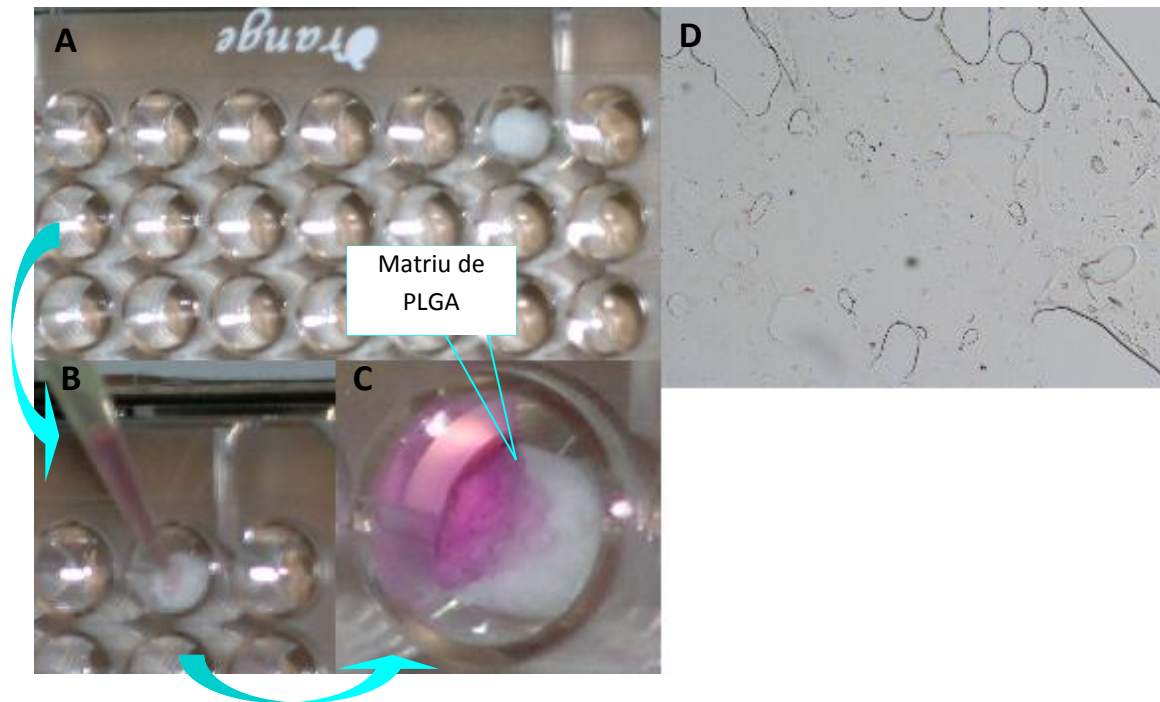


Figura 4.4. Colonització no agitada per difusió: matriu a un pou amb les cèl·lules a sobre que entren a la matriu per gravetat. CMMA humanes de cartílag articular: Inòcul $1E+06$ cèl·lules totals. A -C: muntatge de la colonització. D: Histologia de la matriu de PLGA (tinció Hematoxilina – Eosina) després de colonitzar.

Els constructes que es colonitzen en cultiu no agitat tendeixen a incorporar poques cèl·lules i la majoria se situen a la perifèria de la matriu. La transferència de matèria i l'intercanvi de nutrients amb el medi és limitat en comparació amb el sistemes agitats (Freed et al. 1994). Conseqüentment, el teixit tendeix a evolucionar cap una estirp fibrosa i amb poca organització (Marler et al. 1998; Vunjak Novakovic et al. 1999; LeBaron et al. 2000).

Donat els mals resultats dels mètodes no agitats, es planteja la utilització de sistemes de colonització amb agitació. Aquests sistemes permeten una millora en la mescla dels components i augmenten la transferència de matèria entre el medi de cultiu (líquid) i les matrius (sòlid), afavorint el transport de nutrients i l'eliminació de productes (Freed et al. 1998; Temenoff et al. 2000). Bibliogràficament s'ha descrit una colonització uniforme per tota la matriu amb els sistemes agitats, com el flascó agitat, la perfusió o el bioreactor rotatori (Marler et al. 1998), fet que afavoreix la formació de matriu extracel·lular a la totalitat de l'àrea de la matriu (Temenoff et al. 2000). A més de millorar la colonització, els sistemes agitats han demostrat que posteriorment el cartílag que s'obté és de qualitat superior (Vunjak Novakovic et al. 1999; Temenoff et al. 2000).

En aquest treball, un dels sistemes agitats que s'ha escollit és un tub falcon que conté la matriu i les cèl·lules en suspensió. Aquest tub falcon es manté en constant moviment rotatori amb l'ajuda d'un agitador de balanceig (*roller*). A més, en aquest cas es proven tots els tipus de PLGA amb les diferents mides de porus que s'han fabricat (taula 4.2). A continuació, es presenten els resultats de les colonitzacions realitzades amb CMMA de cartílag i PLGA. Les CMMA es colonitzen a un tub falcon de 50 mL on s'afegeixen 10mL de medi DMEM amb 10% de sèrum. S'utilitza un tap especial amb filtre de 0.22µm per permetre l'intercanvi de gasos i l'absència de contaminació. El *roller* amb els tubs falcon i les matrius amb les cèl·lules en suspensió es mantenen en un incubador de CO₂ a 37°C i 5% CO₂, amb una agitació constant i suau de 40 rpm. La quantitat inicial de cèl·lules que es colonitza és 1.2E+06 CMMA/biomatriu. En aquest cas, per seguir el procés de colonització es determina la concentració cel·lular al sobrenedant, amb una freqüència de mostreig d'una hora. La disminució de la concentració al medi ens dona una indicació de com s'està produint el procés de colonització.

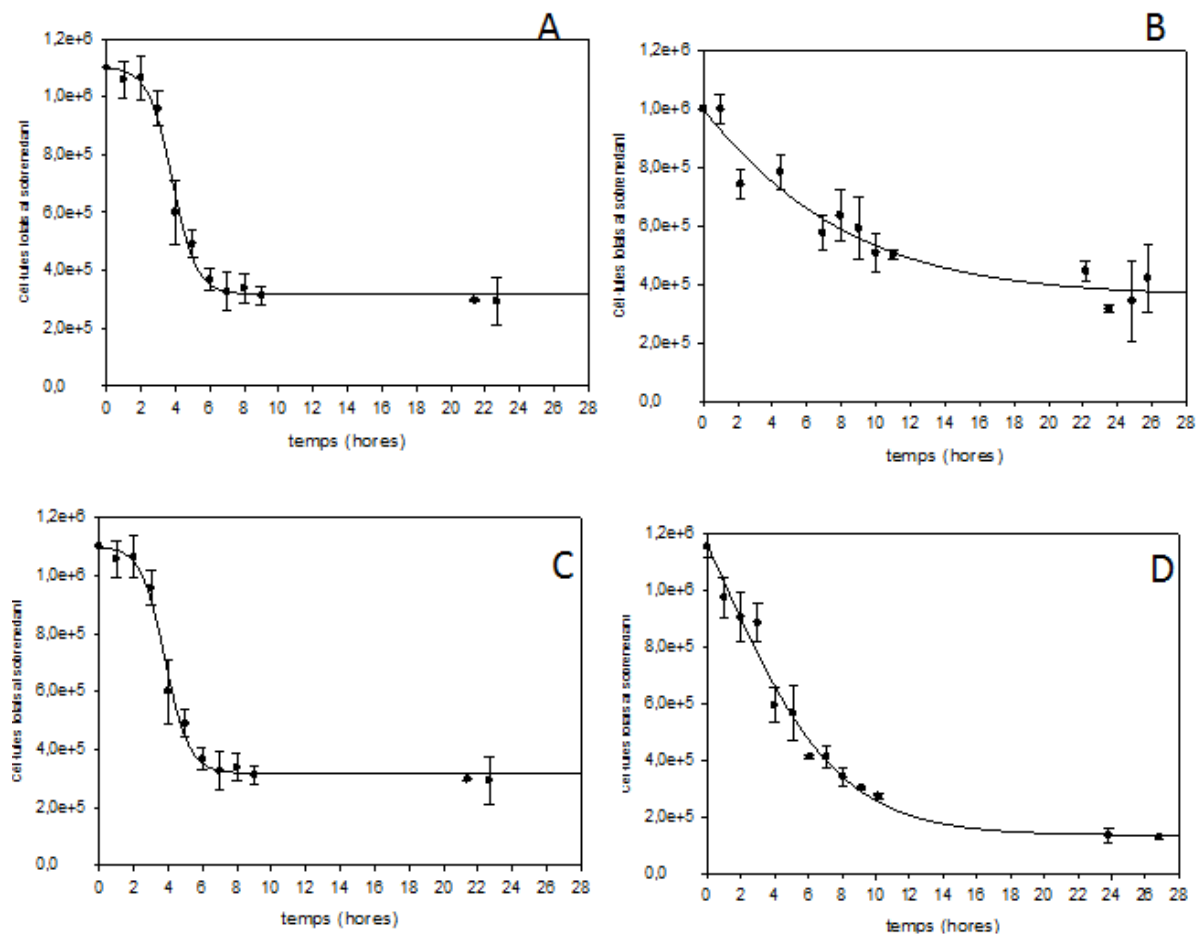


Figura 4.5. Seguiment del procés de colonització de matrius de PLGA 50/50 en el sistema agitat. Evolució de la concentració cel·lular al sobrenedant. Concentració inicial de cèl·lules CMMA de cartílag articular, 1.2E+06. A: porus tipus 1, B: porus tipus 2, C: porus tipus 3, D: porus tipus 4. —●— Cèl·lules totals que queden al sobrenedant del cultiu.

De les quatre colonitzacions realitzades amb els polímers de diferents porus cal destacar que totes elles deixen d'incorporar cèl·lules a dintre de la matriu passades les 16-18 hores i la matriu que més cèl·lules incorpora és la de porus tipus 4. Es veu clarament a la figura 4.5 que les matrius amb porus tipus 4 (figura 4.5.D) deixen entrar més cèl·lules a dintre de la matriu i concretament a les 12 hores ja s'han colonitzat totes les cèl·lules. S'aconsegueix que entrin a la matriu unes $6E+05$ CMMA com a mínim, i com a màxim unes $8,5E+05$ CMMA en el cas del porus tipus 4. Emin i col·laboradors ja van observar que mitjançant un sistema agitat, s'observava fins un 83% d'eficiència en la colonització de les matrius de PLGA, en canvi en el sistema no agitat només s'arribava fins a un 57%, valors molt semblants als obtinguts en els sistemes agitats en aquest experiment (Emin et al. 2008).

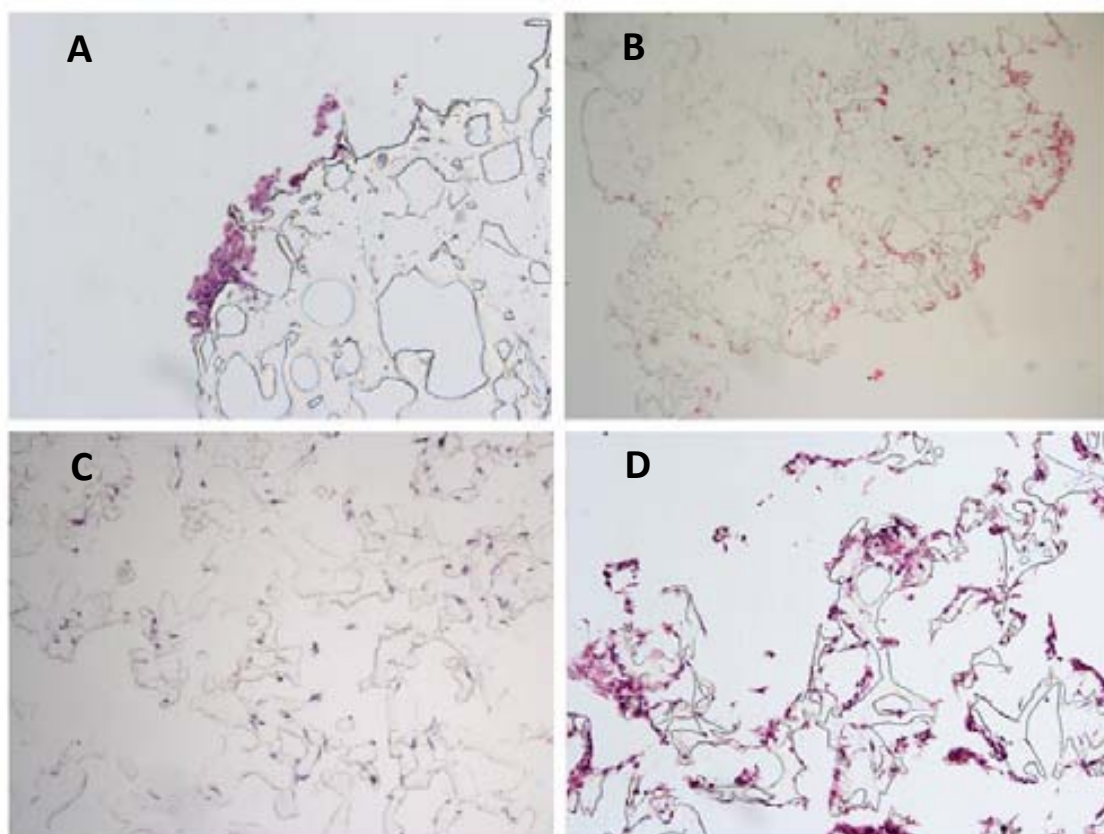


Figura 4.6. Histologia de les colonitzacions amb PLGA de diferents porositats. Tinció Hematoxilina-Eosina. A: Porus tipus 1; B: Porus tipus 2; C: Porus tipus 3; D: Porus tipus 4.

També es pot observar que quan més gran és el porus, més homogènia és la distribució cel·lular a totes les zones de la matriu, tant superficial com interna. Això és degut a que, tal i com es mostra a la figura 4.6, en els polímers PLGA amb porus tipus 1 i 2 les cèl·lules no poden entrar

a l'interior del polímer i només colonitzen la capa externa (figura 4.6.A-B). En el PLGA amb porus tipus 3 algunes cèl·lules aconsegueixen entrar i colonitzar la part de dins (figura 4.6.C). En el cas del PLGA amb porus tipus 4, on la mida del porus no representa cap barrera per a les cèl·lules, la matriu es colonitza homogèniament (figura 4.6.D).

En conclusió, s'escull el porus tipus 4, molt gran, per a realitzar els següents experiments de colonització de matrius, ja que permet la colonització homogènia de la matriu. El sistema de colonització emprat fins ara és un sistema amb agitació rotatòria (40 rpm). És un sistema molt senzill que no permet monitorització ni control del procés de colonització.

Aquest fet ha portat a posar a punt un altre sistema de colonització que utilitza un minibioreactor que funciona amb una agitació pendular (200 rpm) i permet la monitorització de la densitat òptica. A la figura 4.7 es mostren els dos sistemes de colonització anteriorment esmentats.

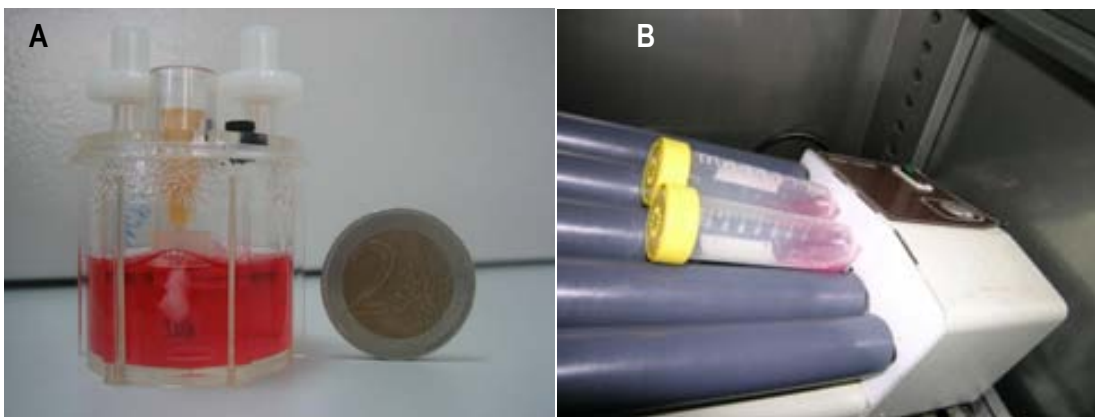


Figura 4.7. Sistemes de colonització dinàmics amb agitació. A: Minibioreactor amb una matriu de PLGA. B: *Roller* amb dos tubs falcons durant una colonització.

A continuació (figura 4.8), es comparen els dos sistemes de colonització. En tots dos casos s'arriba a un nombre de cèl·lules semblant dins de la matriu, tot i que la cinètica de colonització en minibioreactor és més lenta que la del *roller*. En el cas del minibioreactor s'agita el medi a 200 rpm per mantenir les cèl·lules en suspensió i que no s'ancorin a la superfície de plàstic

del minibioreactor, a diferència del sistema *roller* que s'agita a 40 rpm per limitacions de l'aparell. El minibioreactor presenta certs avantatges en quant a la monitorització de variables importants i l'agitació pot ser controlada amb més precisió. Per tant és el sistema que s'utilitza per a colonitzar les biomatrius. La velocitat d'agitació pot influenciar el nombre, la viabilitat i la distribució de les cèl·lules en la matriu, així doncs, una colonització agitada i amb un control més acurat porta a aconseguir majors rendiments en les colonitzacions i les densitats finals de colonització en les matrius (Li et al. 2001).

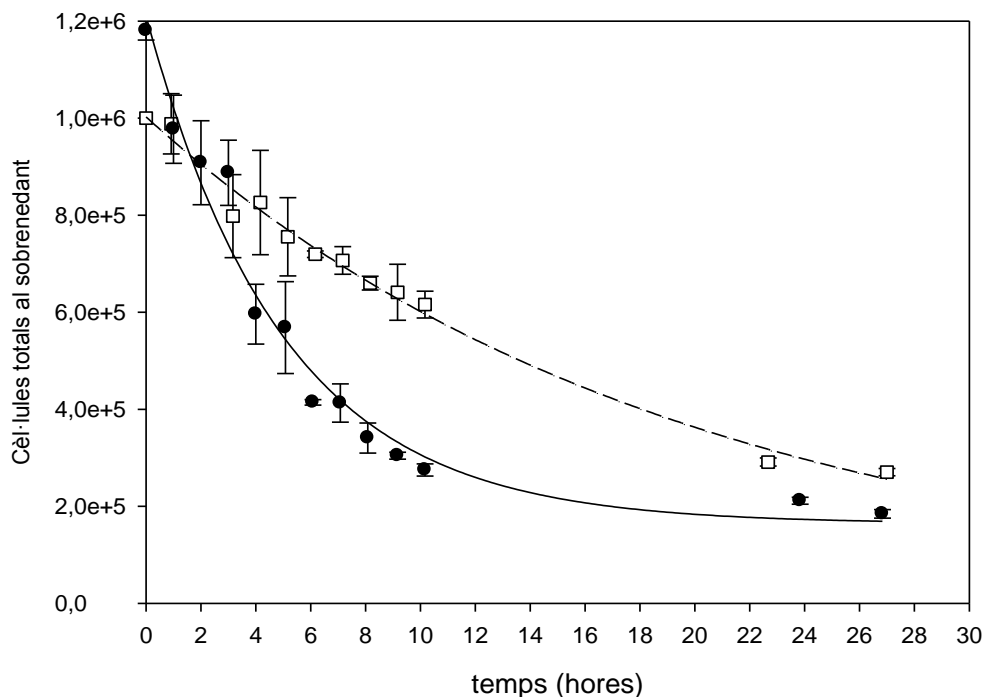


Figura 4.8. Comparació de la colonització de PLGA (50/50 porus tipus 4) segons el tipus de colonització amb agitació. CMMA de cartílag hialí: Inòcul de 1.2E+06 CMMA totals. --□-- Cèl·lules totals que queden al sobrenedant del cultiu en sistema de colonització minibioreactor. —●— Cèl·lules totals que queden al sobrenedant del cultiu en sistema de colonització *roller*.

L'obtenció de la biomatriu de PLGA i la seva manufactura per a la colonització, realitzats mitjançant processos manuals no automatitzats, impliquen un grau de variabilitat inapreciable macroscòpicament. En el cas del *roller* les matrius pateixen certa degradació per el constant xoc d'aquestes amb les parets del tub de centrífuga. Per tant l'elecció del sistema de colonització en minibioreactor es adequada perquè es pot escollir una disposició específica de la biomatriu a dintre d'un minibioreactor (figura 4.9-A) que minimitza el dany que pogués patir aquesta per l'agitació requerida per a la colonització.

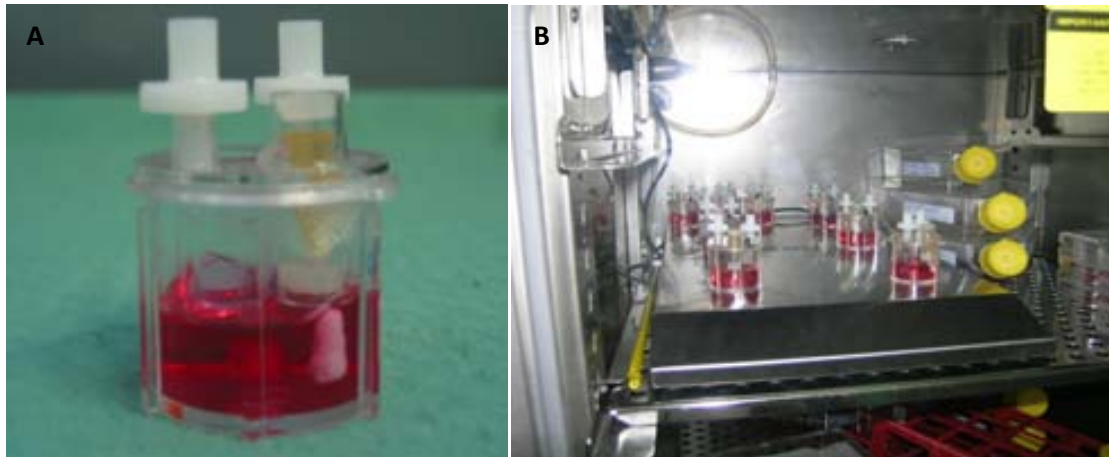


Figura 4.9. A: PLGA en minibioreactor subjecte per una agulla. B: La colonització es porta a terme sobre una placa d'agitació magnètica a dintre de l'incubador de CO₂.

Amb l'objectiu de poder monitoritzar aquest procés de colonització i, d'aquesta manera obtenir polímers de PLGA colonitzats amb la quantitat de cèl·lules desitjada, s'efectuarà el seguiment en línia de l'absorbància del medi de cultiu a partir de la sonda òptica del sistema de minibioreactors Hexascreen®, obtenint informació de la quantitat de cèl·lules restants en el medi de cultiu al llarg del procés.

Per comparar els resultats obtinguts, s'efectua el seguiment en paral·lel de la colonització de les matrius a les tres concentracions equivalents inicials (inòculs de 1.53+06 CMMA totals, 3E+06 CMMA totals i 6E+06 CMMA totals) a partir de mesures fora de línia de la concentració cel·lular present en el medi de colonització. Els resultats obtinguts es poden observar a la figura 4.10, on s'han representat els perfils resultants per a les tres concentracions cel·lulars a partir de les mesures realitzades en línia i fora de línia.

Si s'analitzen els resultats, es manté l'eficiència de colonització al voltant del 80% i en els 3 casos, s'arriba al punt màxim de colonització a les 24 hores. Malgrat l'absència de correspondència entre el valor en línia i fóra de línia en el cas de la colonització amb 6E+06 CMMA, l'evolució de l'absorbància té prou concordança amb les mesures fóra de línia en el cas de 1.5E+06 i 3.0E+06 CMMA, així es podria disposar d'un monitoratge en línia de les colonitzacions de les matrius sense cap risc de contaminació per la pressa de mostra.

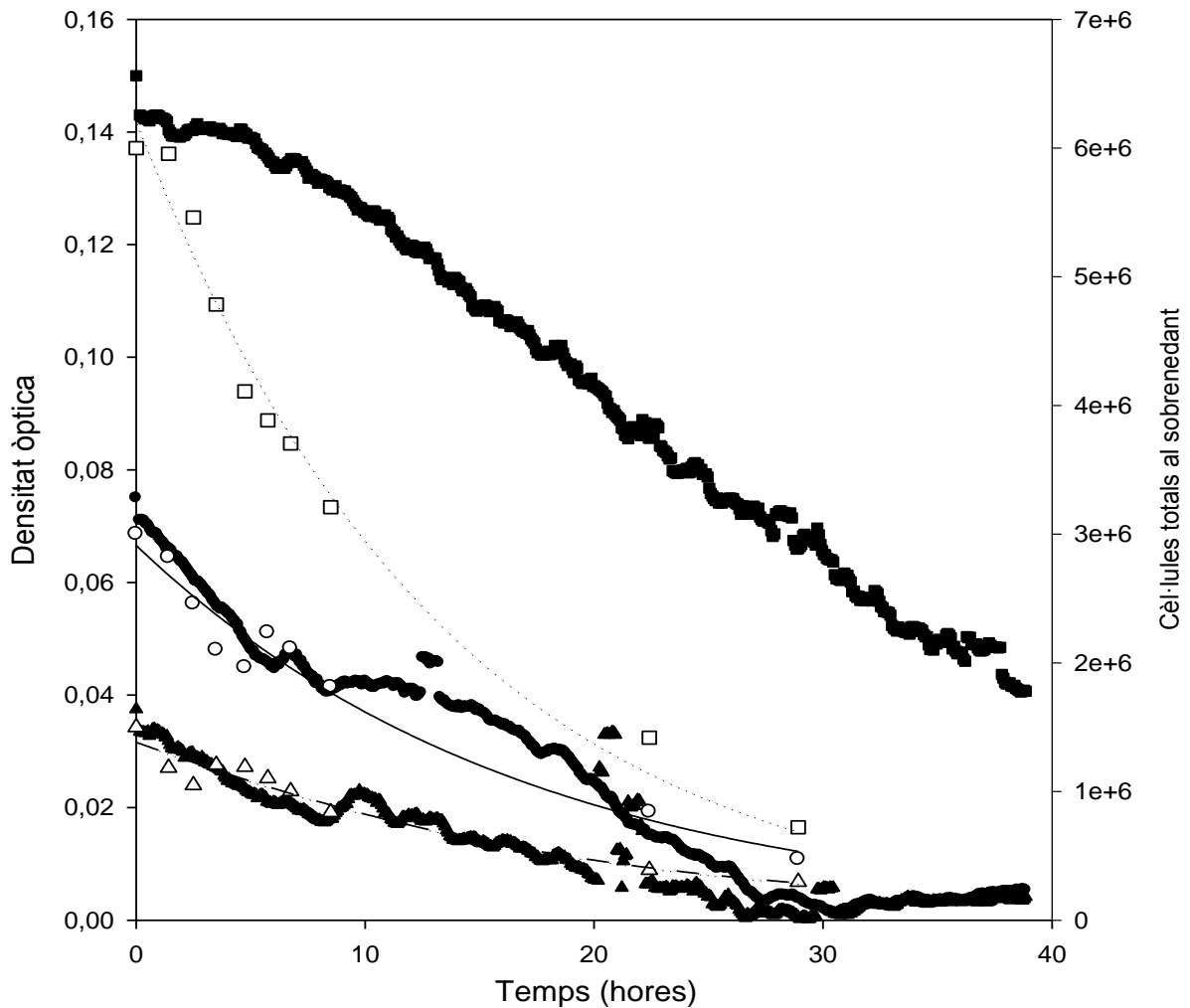


Figura 4.10. Colonització de matriu PLGA 50/50 amb porus tipus 4. C. En 12 mL de medi de cultiu DMEM suplementat al 10% amb sèrum, sense recanvi de medi. CMMA de cartílag hialí. Simbols \blacktriangle per a $1,5E+06$ CMMA totals, \circ per a $3E+06$ CMMA totals i \square per a $6E+06$ CMMA totals. Els que tenen el fons negre corresponen a les cèl·lules totals que queden al sobrenedant del cultiu en sistema de colonització Hexascreen®. Els que tenen el fons blanc corresponen als controls que es recompten manualment.

A continuació es mostren les imatges de les colonitzacions de PLGA amb CMMA de cartílag articular. Cal destacar que malgrat augmentar el número de cèl·lules en alguns dels inòculs ($4E+06$ i $6E+06$) per a la colonització, algunes zones de la matriu continuen sense colonitzar-se correctament.

Es pot observar com la figura 4.11-B, ens mostra una zona negativa per a la Safranina O, ja que aquesta tècnica tenyeix de rosa els glucosaminoglicans característics del cartílag hialí i com era d'esperar, amb 24 hores de cultiu les cèl·lules no han estat capaces de generar una matriu extracel·lular equivalent a la del cartílag hialí. Si que es pot veure que si s'augmenta l'inòcul, les

zones que estan més colonitzades, presenten una matriu extracel·lular millor definida. Per últim, la immunohistoquímica per a col·lagen tipus II de la figura 4.11-D ens mostra, a l'igual que la safranina, un resultat negatiu com seria d'esperar en un cartílag immadur.

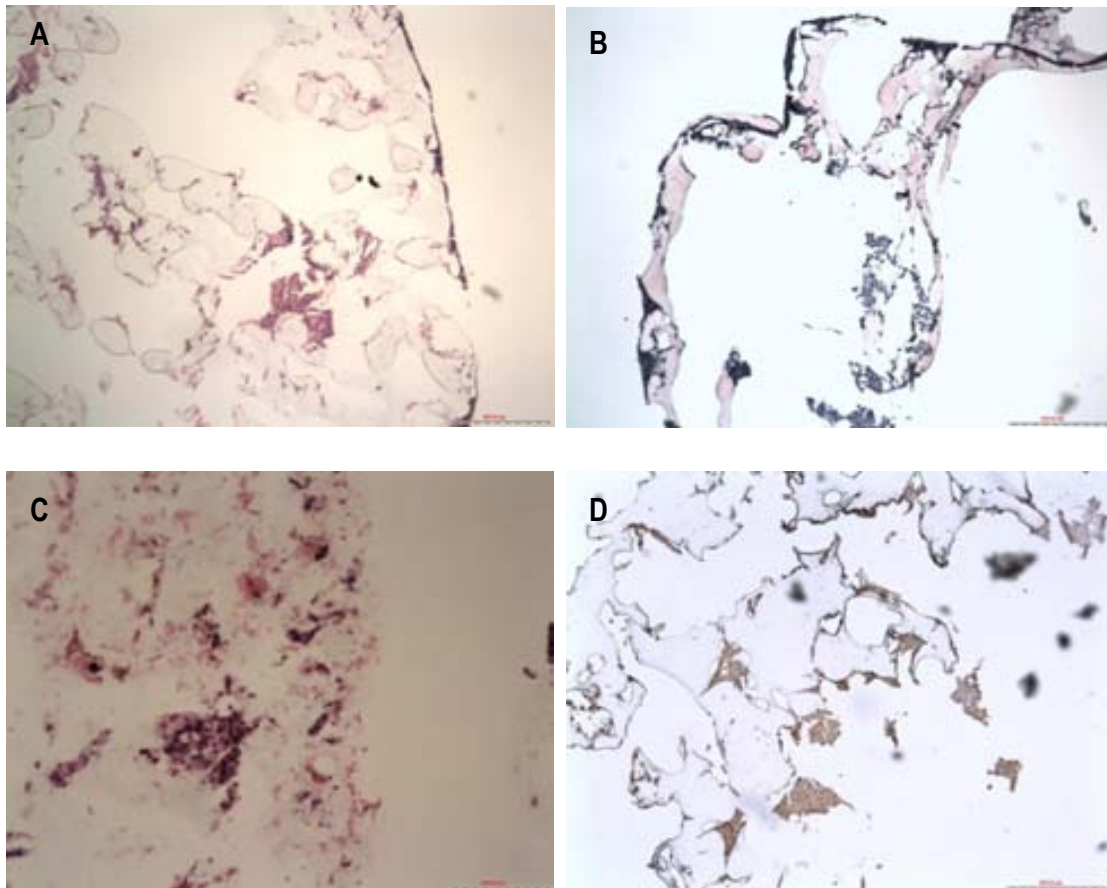


Figura 4.11. Imatges d'histologia de la colonització amb Hexascreen®. A: Hematoxilina-Eosina de PLGA colonitzat amb 4E+06 CMMA totals; B: Safranina O de PLGA colonitzat amb 6E+06 CMMA totals; C: Hematoxilina-Eosina de PLGA colonitzat amb 2E+06 CMMA totals; D: Immunohistoquímica de Col·lagen II de PLGA colonitzat amb 4E+06 CMMA totals.

En resum, s'ha desenvolupat un polímer cilíndric amb unes dimensions que es poden controlar i modificar, si escau, durant el procés de producció. La biomatriu és bioreabsorbible i presenta una porositat suficient per permetre la colonització per part de les CMMA. En aquest cas, s'ha determinat que la mida dels porus, corresponent al tipus 4 (taula 4.7), han d'estar entre 0.3mm i 0.5mm per poder colonitzar les CMMA i que aquestes es distribueixin homogèniament en les cavitats poroses internes, i no només per la superfície. La biomatriu amb les cèl·lules colonitzades no presenta condrogenicitat en les primeres 24 hores, fet coherent amb la seqüència

de síntesi dels components de la matriu extracel·lular del cartílag hialí, on els diferents components tarden en aparèixer entre 2 i 12 dies, tal i com s'observa a la figura 4.12.

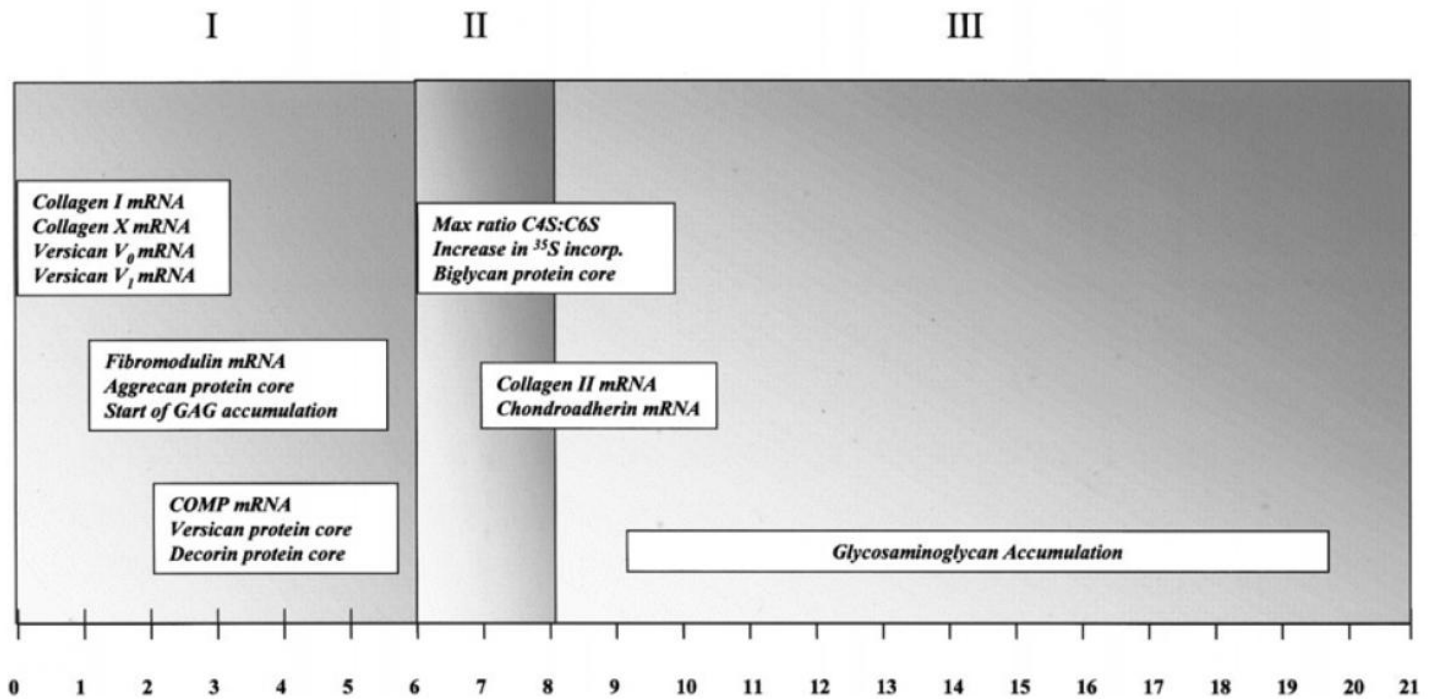


Figura 4.12. Evolució (dies) de la síntesi dels components extracel·lulars secretats, al llarg de la diferenciació de cultius de CMMA cultivades en medi de diferenciació condrogènica (Barry et al. 2001).

El sistema de colonització en minibioreactor Hexascreen® resulta fiable y eficaç, ja que s'observa un 80% d'eficiència de colonització, i es constata l'absència de contaminacions durant la colonització. Un cop establert el sistema de colonització, en el següent apartat s'exposa la caracterització d'aquests constructes per a definir millor la seva utilització.

4.3. Caracterització dels biopolímers

A la bibliografia existeixen suficients evidències com per afirmar que les condicions del cultiu *in vitro* influeixen en gran mesura en la formació de cartílag (Van der Kraan et al. 2002). Entre d'altres factors que poden influir en la formació de cartílag es troben els factors de creixement o la pressió parcial d'oxigen. El cultiu dels constructes en bioreactors ofereix certs avantatges com el creixement amb un nivell de nutrients constant i uniforme (Temenoff et al. 2000).

Com ja s'ha comentat a la introducció, l'estratègia d'aquest treball és diferència de les aproximacions més habituals en la investigació bàsica en el camp de la medicina regenerativa per a tractar lesions de cartílag articular, ja que es planteja una estratègia similar a Uematsu i col·laboradors (Uematsu et al. 2005). Les CMMA es colonitzen a les matrius de PLGA, però no es cultiven durant un període de temps, sinó que després de la colonització s'implanten directament a la lesió a regenerar.

Una vegada definides les condicions de la colonització, aconseguint que les CMMA es distribueixin homogèniament per tota la superfície interna de la biomatriu, es vol caracteritzar el constructe que s'ha desenvolupat, a diferents nivells, tant molecular com histològic. Es realitza un estudi a nivell de degradació del polímer i de l'evolució d'aquest en cultius *in vitro* de llarga durada.

Es realitza un estudi de la degradació del polímer *in vitro*, analitzant així la capacitat d'aquest per suportar les condicions de cultiu. A l'experiment es segueix l'evolució temporal de la pèrdua de pes de les matrius de PLGA 50/50 sense colonitzar, en medi de cultiu estèril en un incubador de CO₂ a 37°C i 5% CO₂. Es pesen els polímers i es posen en plaques de 12 pous amb 1,5 mL de medi DMEM. Cada setmana s'agafen dues matrius, es renten amb H₂O destil·lada, es liofilitzen per treure l'aigua i es tornen a pesar. El càlcul de la pèrdua de pes de la matriu s'obté del quocient entre el pes final i l'inicial expressat en tant per cent.

A la figura 4.13 es pot veure que no és fins a partir de la cinquena setmana quan el polímer comença a degradar-se, i no és fins la sisena setmana que la degradació és total, amb una pèrdua del 80% del pes. Per tant, es poden realitzar cultius de fins a 4 setmanes, mantenint l'estructura de la matriu.

Si es realitza una colonització de la matriu, les cèl·lules han d'emplenar els buits que presenta la matriu porosa, i si es presenten els senyals adients per a la generació de ME hialina, en el cas del cartílag, es formarà un neoteixit que parará el procés de degradació o reabsorbirà la matriu en el cas que estigui en un ambient funcional com una lesió osteocondral.

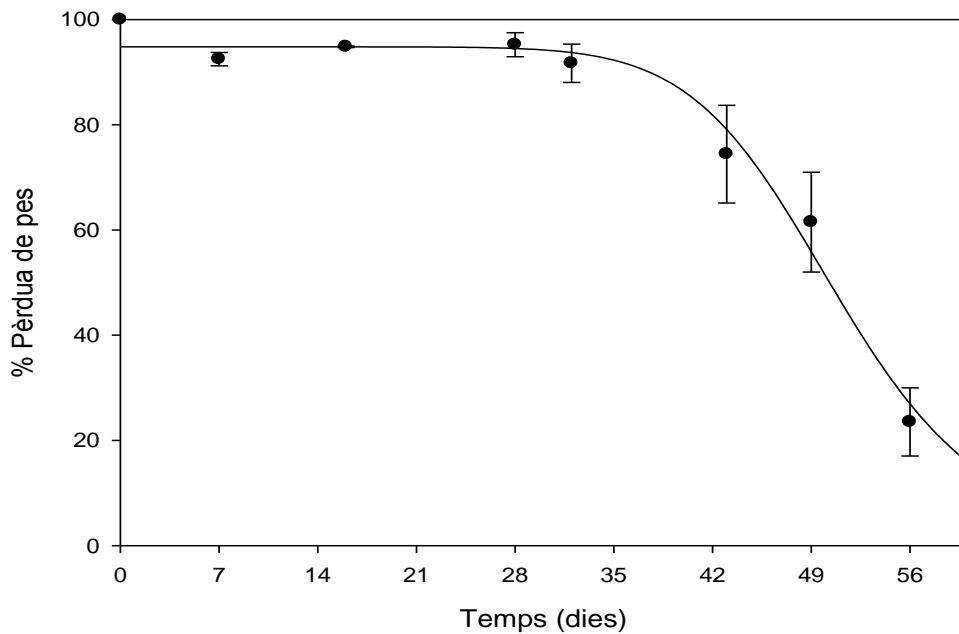


Figura 4.13: Evolució de la degradació del PLGA 50/50 en medi estèril DMEM suplementat al 10% amb FCS. Condicions: concentració de CO₂ 5%, humitat 95%, temperatura 37°C. ●— percentatge de pes del polímer respecte el pes inicial.

Encara que no coincideixi amb l'estratègia esmentada, es decideix estudiar els constructes en cultius a llarg termini *in vitro* per veure si l'estructura tridimensional de la matriu permet la rediferenciació de les cèl·lules CMMA prèviament a la seva introducció en el model animal. Es cultiven tres matrius durant un temps de 10 i 20 dies, per a fer un estudi més complet de la evolució després de la seva colonització. De les tres matrius que s'han colonitzat, M1 es va aturar el seu cultiu el dia 10, M2 el dia 20 i la matriu control (MC) el dia 20. Les matrius de PLGA es colonitzen amb 1.2E+06 CMMA humanes de cartílag articular. Es fa un seguiment, cada 2-3 dies, dels consums de glucosa i producció de lactat per caracteritzar l'activitat metabòlica de les cèl·lules un cop adherides a la matriu i durant el cultiu cel·lular. Les matrius es varen colonitzar en minibioreactor i s'efectuaren dos recanvis de medi, després de la colonització i al dia 12 de cultiu (figura 4.14).

Les CMMA de cartílag adherides al PLGA tenen un metabolisme actiu, tal i com es pot comprovar a la figura 4.14. Si es comparen els polímers que s'han colonitzat, amb un control negatiu sense cèl·lules, es comprova que el control negatiu no consumeix glucosa en absolut. En el cas del lactat, veiem una certa producció d'aquest, que pot ser degut a la degradació del polímer que conté ja que està format en part per polilàctic, llavors pot alliberar àcid làctic al medi si existeix

degradació. Per tant s'ha de vigilar amb els cultius amb cèl·lules, ja que a banda del propi lactat que ja eliminen les cèl·lules, s'hauria de tenir en compte el que allibera el mateix polímer de PLGA. El lactat és un subproducte del metabolisme de la glucosa i és tòxic per a les cèl·lules animals que pot inhibir el creixement a una determinada concentració. Així, el sistema de cultiu de polímers amb cèl·lules ens proporciona un entorn viable per al creixement de les cèl·lules, però s'ha de tenir molt de compte amb els problemes de contaminacions ja que les manipulacions d'aquests constructes és molt delicat quan es fan recanvis de medi, ja que no s'ha d'alterar ni fer malbé l'estructura del polímer. Els recanvis de medi són essencials perquè permeten eliminar el lactat del medi, un creixement adequat de les cèl·lules, una millor rediferenciació cap al llinatge cartilaginós i la producció de matriu extracel·lular per part de les CMMA en PLGA.

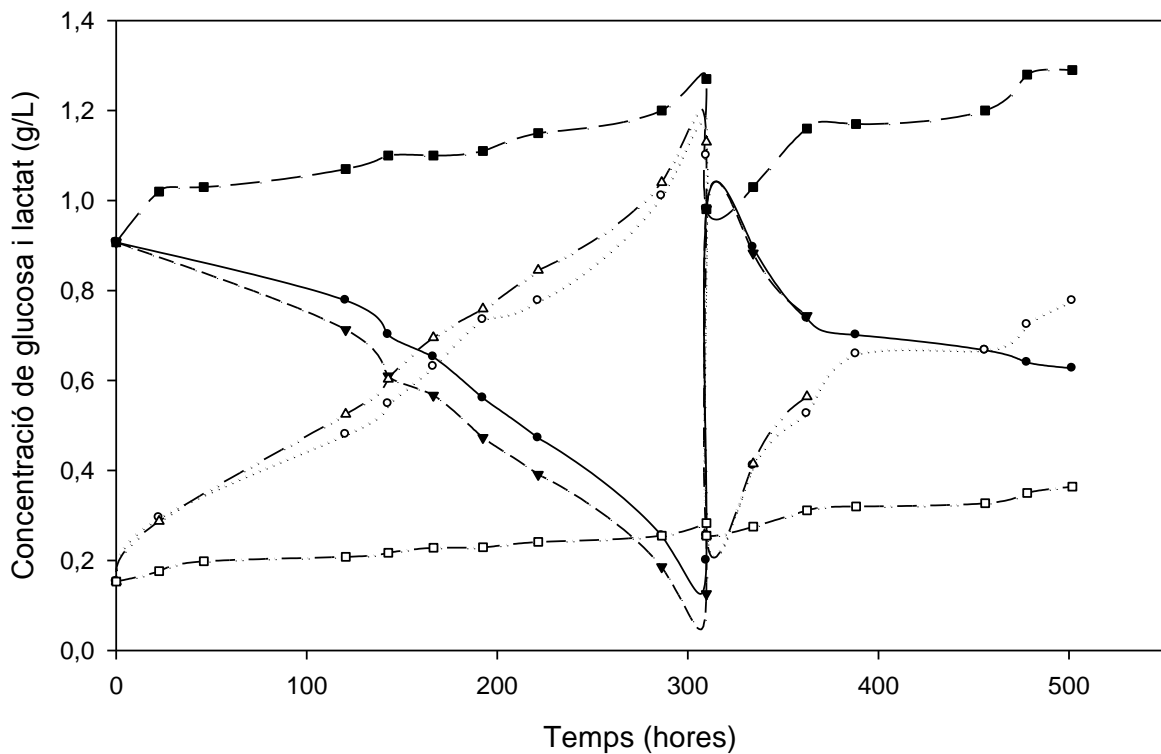


Figura 4.14. Evolució de les concentracions de glucosa i lactat en colonitzacions de PLGA cultivades de 10 i 20 dies de durada. Símbols: \triangle Lactat-M1 (fins a 10 dies); \blacktriangledown Glucosa-M1 (fins a 10 dies); \circ Lactat-M2 (fins a 20 dies); \bullet Glucosa-M2 (fins a 20 dies); \square Lactat MC (matriu control); \blacksquare Glucosa MC.

A la finalització de l'experiment, ja s'observen diferències a nivell macroscòpic. A la figura 4.15 es mostra a l'esquerra la matriu M2 amb la seva geometria i macroestructura conservades, en canvi, a la dreta es mostra la MC que ha augmentat considerablement el seu volum i ha perdut

consistència i densitat, fet que es pot observar directament per la seva aparença macroscòpica. Aquest efecte de manteniment de l'estructura durant el temps que ha estat en cultiu, es pot atribuir a l'evolució que han tingut les matrius colonitzades, on molt probablement s'ha sintetitzat matriu extracel·lular que ha donat una cohesió interna a la matriu i permet mantenir la forma i estructura macroscòpica.

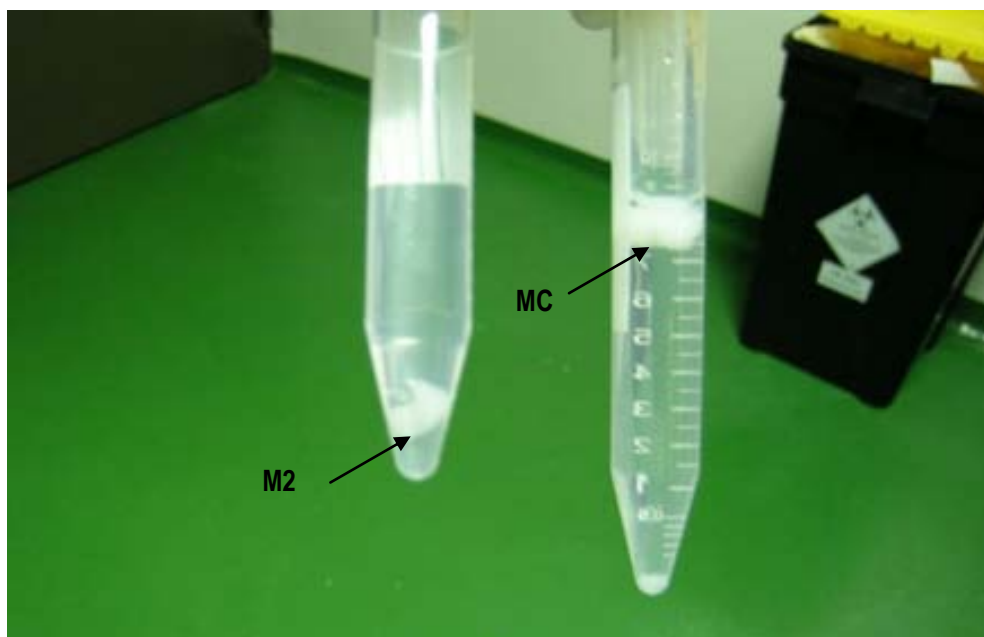


Figura 4.15. Aspecte macroscòpic de les matrius (senyalades amb les fletxes negres) després de 20 dies de cultiu. A l'esquerra la matriu colonitzada per CMMA i a la dreta la matriu no colonitzada.

A nivell microscòpic s'han analitzat les matrius segons els protocols posat a punt pel Departament de Ciències Morfològiques de la UAB i a la Unitat d'Histologia del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la UAB. Cal destacar la gran dificultat que han presentat les matrius per a la seva inclusió i parafinització per a l'obtenció de talls histològics. S'han utilitzat dos mètodes per fixar les cèl·lules, el mètode de parafinització clàssic (apartat 7.5.4.) i el criostat, per intentar millorar la resolució de les imatges dels polímers PLGA amb CMMA. El primer que s'ha de fer notar és la degradació del polímer en el procés de tall, ja sigui per criostat o per microtom. Existeixen tècniques alternatives al processat de matrius biodegradables per a la seva observació histològica, però són molt tedioses i els resultats que s'extreuen són similars als obtinguts en aquest treball (Karen 1999).

A la figura 4.16-B s'observa com les cèl·lules als 10 dies han colonitzat tota la superfície interna del polímer. Els espais buits que s'observen en blanc a la figura 4.16-B, corresponen a les zones poroses. El tractament amb parafina o el criostat deforma la matriu i resulta de difícil anàlisi. Als 20 dies (figura 4.16-A), s'observa una morfologia cel·lular més fusiforme, deixant de ser fibroblàstica, tendint més cap a una morfologia condrocitoide, en comparació a la fibroblàstica que presenta en monocapa.

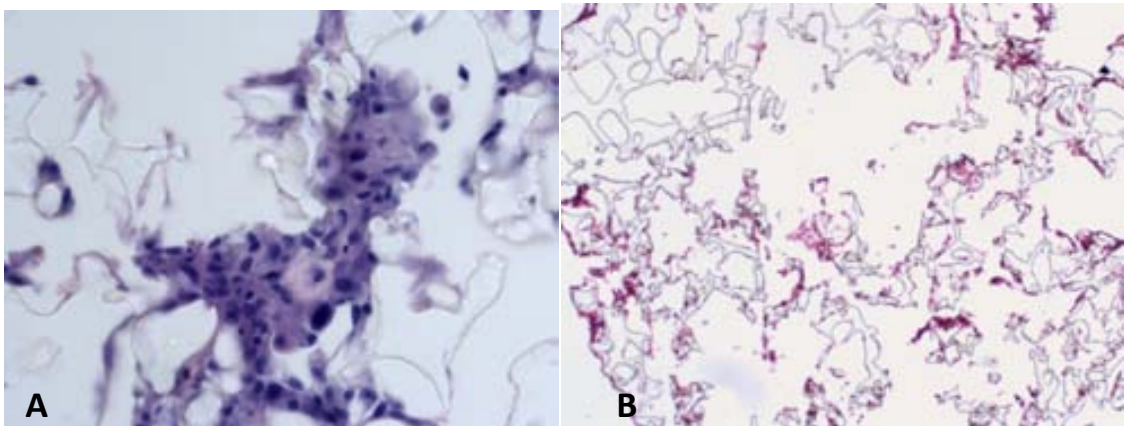


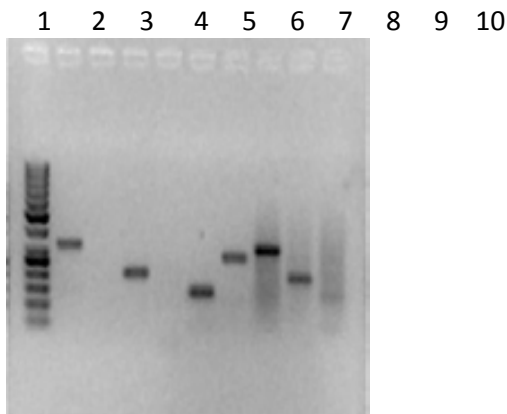
Figura 4.16. Imatges d'histologia del cultiu de llarga durada amb minibioreactor. A: Hematoxilina-Eosina de PLGA colonitzat amb $1E+06$ CMMA als 20 dies (125x); B: Hematoxilina-Eosina de PLGA colonitzat amb $1E+06$ CMMA als 10 dies (63X)

L'últim anàlisi que es realitza a les matrius cultivades durant 10 i 20 dies, és l'anàlisi de l'expressió genètica de determinats marcadors. A la bibliografia s'han descrit alguns dels marcadors de condrogènesi més importants per determinar la rediferenciació dels condrocits, alguns d'ells són el col·lagen tipus I, tipus II i Aggrecan. Per l'anàlisi dels polímers es fa una extracció d'Àcid Ribonucleic (ARN) mitjançant la tècnica descrita a l'apartat 7.5.3.1. Un cop s'obté l'ARN extret es comprova la seva qualitat amb un gel d'Agarosa (2%), identificant la subunitat 18S que indica una qualitat acceptable per aquesta tècnica.

Per a efectuar aquesta caracterització genètica s'analitzarà, mitjançant la tècnica de la RT-PCR, l'expressió dels gens GAPDH, Aggrecan, Biglycan, TGF- β , Col·lagen I i Col·lagen II. Amb aquesta tècnica s'obté informació sobre l'expressió gènica en el moment de la extracció de l'ARN. Aquests ARN es converteixen en els ADN corresponents amb l'enzim transcriptasa inversa (RT-PCR), i després amb l'enzim polimerasa s'amplifiquen aquestes cadenes d'ADN durant un

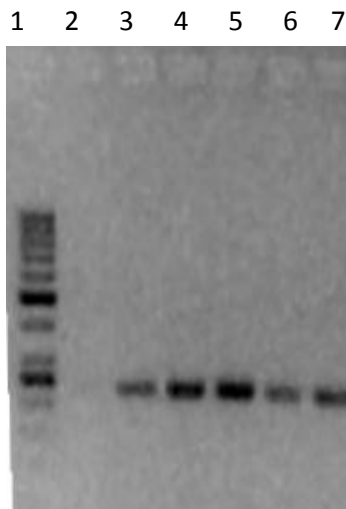
determinat nombre de cicles. Aquest material genètic amplificat pot ser observat en gels d'agarosa, on també es visualitzen els controls positius preparats a partir del propi cartílag hialí, així es pot saber si s'ha amplificat la cadena d'ADN amb el mateix pes molecular que el que s'està analitzant.

S'utilitza el gen del GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa) com a gen d'expressió constitutiva, és un dels enzims involucrats en la glicòlisis, és un marcador que ha de donar positiu en totes les cèl·lules i, per tant, s'utilitza com a control positiu de l'estat de l'ARN extret de la població cel·lular a analitzar (Antonitsis et al. 2007). A les següents figures es mostren les RT-PCR que s'han visualitzat mitjançant gels d'agarosa (2%).



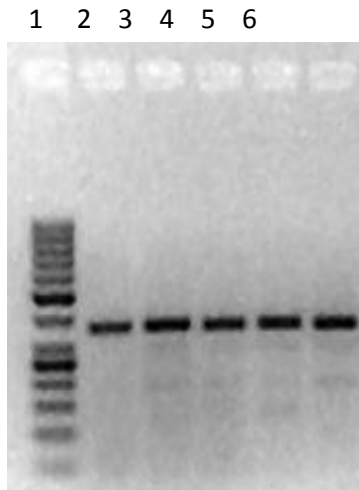
- Carril 1: Marcador de pes molecular.
- Carril 2 : GAPDH de cartílag hialí oví.
- Carril 4: Byglican de cartílag hialí oví
- Carril 5: Col·lagen tipus I de cartílag hialí oví.
- Carril 6: Col·lagen tipus II de cartílag hialí oví.
- Carril 7: TGF-β de cartílag hialí oví.
- Carril 8: GAPDH de CMMA en monocapa.
- Carril 9: Byglican de CMMA en monocapa
- Carril 10: Col·lagen tipus II de CMMA en monocapa

Figura 4.17. Anàlisi de l'expressió gènica per RT-PCR per a mostres de cartílag hialí oví i cultiu en monocapa de CMMA obtingudes de cartílag hialí oví. El carril 3 es va deixar buit.



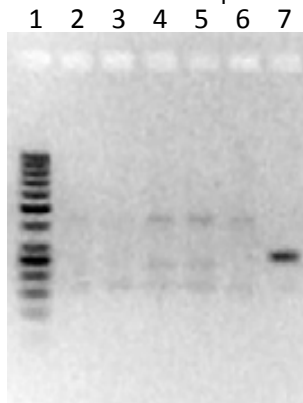
- Carril 1: Marcador de pes molecular
- Carril 3: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
- Carril 4: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
- Carril 5: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
- Carril 6: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
- Carril 7: Control positiu amb cartílag hialí oví.

Figura 4.18. Anàlisi de l'expressió gènica de GAPDH per RT-PCR per a mostres de PLGA colonitzades als temps de 10 i 20 dies. El carril 2 es va deixar buit.



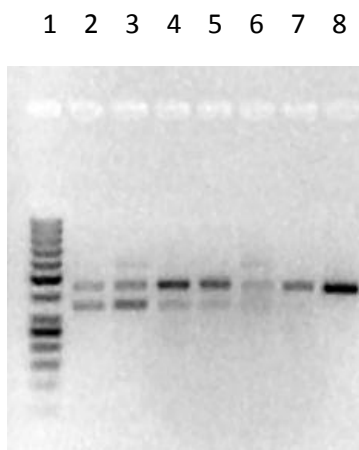
Carril 1: Marcador de pes molecular.
Carril 2: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 3: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 4: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 5: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 6: Control positiu amb cartílag hialí oví.

Figura 4.19. Anàlisi de l'expressió gènica de Col·lagen tipus II per RT-PCR per a mostres de PLGA colonitzades als temps de 10 i 20 dies.



Carril 1: Marcador de pes molecular.
Carril 2: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 3: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 4: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 5: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 7: Control positiu amb cartílag hialí oví.

Figura 4.20. Anàlisi de l'expressió gènica de Col·lagen tipus I per RT-PCR per a mostres de PLGA colonitzades als temps de 10 i 20 dies. El carril 6 formava part d'un altre experiment.



Carril 1: Marcador de pes molecular.
Carril 2: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 3: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 10 dies de cultiu.
Carril 4: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 5: PLGA 50:50 inòcul $1,2E+06$, 20 dies de cultiu.
Carril 8: Control positiu amb cartílag hialí oví.

Figura 4.21. Anàlisi de l'expressió gènica d'Aggrecan per RT-PCR per a mostres de PLGA colonitzades als temps de 10 i 20 dies. Els carrils 6 i 7 formaven part d'un altre experiment.

Els controls amb el gen GAPDH (figura 4.18) són positius, per tant s'assegura la qualitat de l'ARN extret dels cultius per a l'anàlisi de la resta de marcadors. Els resultats dels gels d'agarosa mostren unes cèl·lules actives, sintetitzant el RNA de l'agrecan (figura 4.21) que forma part de la matriu extracel·lular del cartílag hialí. Això pot fer pensar que s'està produint matriu extracel·lular i s'estan donant les condicions necessàries per a la diferenciació condrocitària. En canvi, l'expressió negativa de col·lagen tipus II (figura 4.20) de les matrius de PLGA respecte al control (ARN de cartílag hialí), fa sospitar una activitat metabòlica elevada, expressió de col·lagen tipus I i agrecan, però la matriu extracel·lular que s'està generant no és la característica del cartílag hialí. Si s'observa la figura 4.21., es veu com als 20 dies la intensitat de l'agrecan és major, fet que es pot explicar per la expressió tardana de l'agrecan en la condrogènesi (Chen et al. 2003).

4.4. Prova pilot per a la regeneració d'una lesió osteocondral generada artificialment mitjançant artroscòpia, en animal model.

Una vegada completats els estudis a nivell d'expressió cel·lular i colonització de matrius PLGA, que ja permeten disposar d'una metodologia d'expansió per preparar els constructes a implantar, es planteja ara la posada a punt de tota metodologia per al treball amb el model animal triat, l'ovella. En primer lloc es desenvolupa un experiment pilot, que serveixi per integrar i coordinar totes les etapes necessàries en els experiments en animals, per tal de definir millor les posteriors sèries d'experiments que es descriuran al capítol 5.

El disseny de l'experiment pilot, ha estat influenciant de manera directa sobre el desenvolupament del constructe cèl·lula-biomatriu de PLGA amb CMMA provinent de cartílag articular que s'ha posat a punt. Els motius per escollir el polímer han estat explicats anteriorment, però en el cas del tipus cel·lular per a la prova pilot, cal dir simplement que s'han escollit les CMMA provinents de cartílag articular perquè són les que el grup d'investigació disposa de més experiència en l'aïllament i el cultiu. A la figura 4.22 es mostra un esquema del experiment pilot que s'ha portat a terme.



Figura 4.22. Esquema de l'experiment pilot que s'ha dissenyat per posar a punt les metodologies i els protocols per a la realització d'un futur assaig preclínic.

Es van utilitzar 12 extremitats posteriors, provinents de cadàver d'ovella, per posar a punt la tècnica per part dels traumatòlegs encarregats de la realització de les artroscòpies, ja que l'anatomia de l'ovella és similar però no idèntica a la humana. Un cop establerts els portals d'entrada a les extremitats posteriors es van practicar lesions osteocondrals en el còndil femoral medial i lateral per artroscòpia, d'acord amb l'aproximació plantejada en aquest treball.

Tal i com s'ha comentat a la introducció, s'utilitza en aquest primer experiment el còndil medial perquè és el que més carrega biomecànica suporta en el cas de les ovelles. Cada lesió osteocondral generada presenta unes mides de 3.5mm de diàmetre i 5mm de profunditat. Inmediatament després de la lesió, s'implanten matrius amb diferents relacions diàmetre/alçada (mm/mm): 3.5/5, 4/7, 7/9, en referència al de la lesió. Després de realitzar l'artroscòpia i la implantació de les matrius, es realitza una artrotomia per avaluar l'aspecte, la localització, l'extensió de les lesions produïdes, el grau de fixació i l'adaptació de les matrius implantades (figura 4.23).

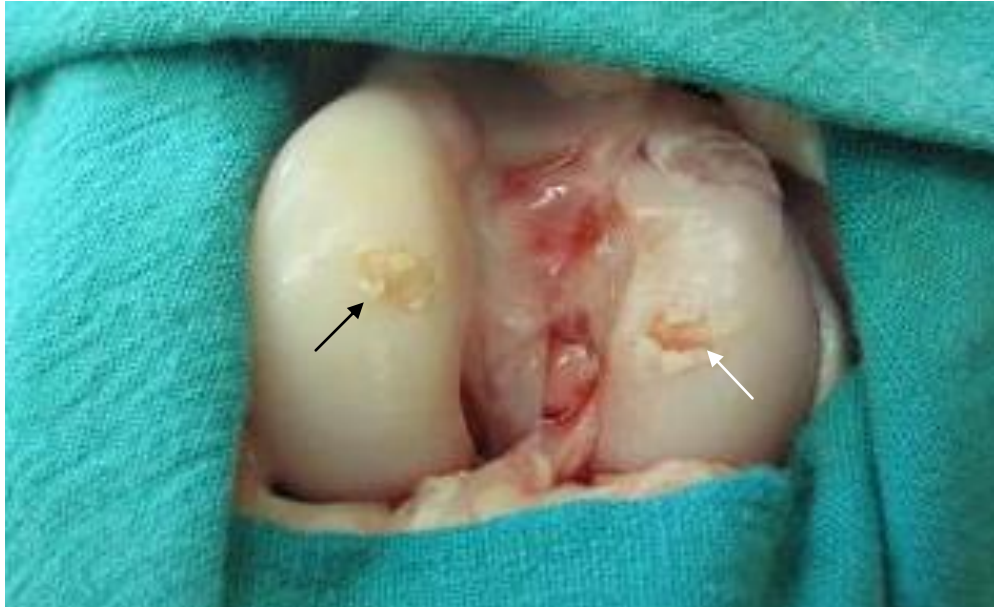


Figura 4.23. Articulació del genoll en cadàver d'ovella. A l'esquerra es troba implantada la matriu de relació diàmetre/alçada 4/7 (fletxa negra) i a la dreta la matriu de relació diàmetre/alçada 3.5/5, idèntica a la lesió generada (fletxa blanca).

Totes les proves van ser realitzades amb la supervisió d'un metge especialista en traumatologia, disminuint així el biaix sistemàtic. A la figura 4.23 s'observa que la lesió es reproducible ja que ambdues són idèntiques, i en totes les proves realitzades s'ha aconseguit implantar la matriu i que quedi fixada. En les diferents proves efectuades s'observa l'efecte del diàmetre i l'alçada de la matriu implantada respecte al de la lesió generada. Així té dos components importants, d'una banda, que la matriu quedi ben subjecta, i l'altra l'anivellament amb la superfície adjacent del còndil. A la figura 4.23 es presenta un exemple. Al còndil de l'esquerra s'ha implantat una matriu de diàmetre 4mm i una alçada de 7mm, que presenta un grau d'adaptació i fixació a la lesió sense comprometre la porositat de la matriu i obtenint una bona congruència articular. Al còndil de la dreta s'ha implantat una matriu de diàmetre 3.5mm i una alçada de 5mm, és a dir, de la mateixa mida que la lesió, i sota l'avaluació macroscòpica s'observa que no hi ha congruència i presenta una fixació més dolenta.

Per definir la mida de la matriu, es van tenir en compte els resultats obtinguts en les proves preliminars i els publicats en altres models animals. En conills, (Makino et al. 2004) van constatar una millor evolució dels empelts osteocondrals amb un diàmetre lleugerament superior a la lesió, en ajustar-se millor a aquesta lesió. D'altra banda, en l'espècie ovina, (Huang et al. 2004)

van observar una millor evolució de les lesions osteocondrals en utilitzar empelts anivellats amb la superfície articular, fet que determina l'evolució favorable de la possible regeneració que es pugui donar. Per aquest motiu, es va optar que l'implant correspondria a una matriu de PLGA de diàmetre 4mm i una alçada de 7mm, que durant l'artroscòpia es pugui impactar, ajustar i anivellar, respecte a la superfície condilar.

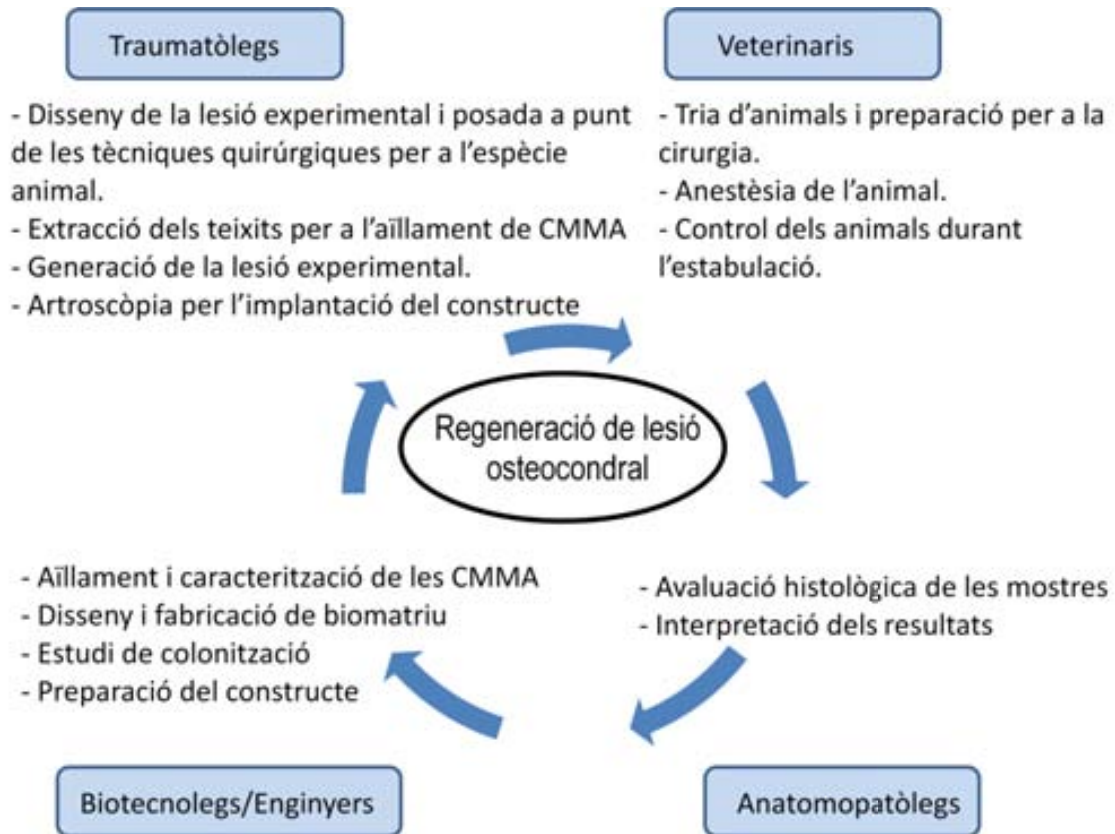


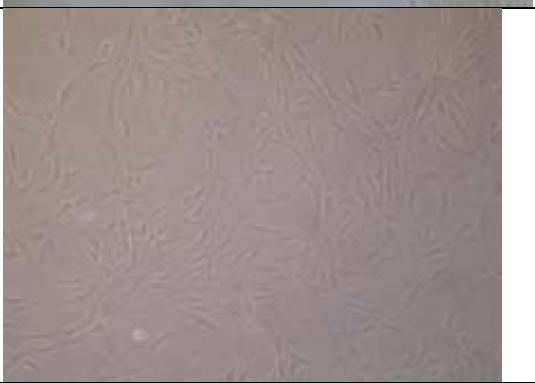



Figura 4.24. Participació de diferents professionals en l'experiment en animal model.

Finalment, una vegada determinades les condicions de realització de les lesions i la mida de l'implant, es disposa de tots els elements per a abordar l'experiment amb l'animal model ovella. Per a dur-lo a terme, cal la intervenció coordinada d'un equip multidisciplinari, com es descriu a la figura 4.24. També cal planificar correctament la durada de totes les etapes. Per exemple, l'expansió cel·lular i la seva durada s'han de planificar amb cura per tal de disposar dels espais, material i permisos per a dur a terme l'implant en el moment oportú. A la taula 4.3. es detalla el disseny de l'experiment pas a pas i s'il·lustra a una imatge representativa del pas corresponent, i la durada aproximada que s'estima per a cada pas.

Taula 4.3. Diferents etapes de la prova pilot per a la regeneració de defectes osteocondrals, creats artificialment mitjançant artroscòpia, amb CMMA colonitzades en PLGA, implantades al defecte mitjançant artroscòpia.

<p>1. Extracció del cartílag hialí d'una zona articular mitjançant una artrotomia de la zona escapulohumeral ovina. Durada aproximada: 2-3 hores.</p>	
<p>2. Disgregació mecànica (amb bisturí) i enzimàtica (amb col·lagenasa tipus II) del cartílag en plaques de 6 pous, per l'aïllament de condrocits. Durada aproximada: 24-48 hores.</p>	
<p>3. Expansió cel·lular fins arribar al 80-90% de confluència i la superfície necessària (entre 150 i 600 cm²), per aconseguir un mínim de 6E+06 CMMA. Durada aproximada: 25-40 dies</p>	
<p>4. Colonització. Cada matriu es col·loca a dintre d'un minibioreactor estèril amb 12ml de medi DMEM+10% sèrum amb 3E+06CMMA, en un placa d'agitació magnètica a 200rpm. Durada: 24 hores.</p>	

<p>5. Generació de la lesió mitjançant artroscòpia. Durada aproximada: 2-3 hores.</p>	 Aquesta imatge mostra una cirurgia artroscòpica. Un cirurgianet, amb guants blancs i vestit amb bata verda, està treballant a través d'una incisió mínima. S'utilitzen instruments artroscòpics per crear una lesió controlada a la superfície del cartílag articular. El pacient està anestesiat i cobert amb draps estèrils.
<p>6. Implantació del constructe per artroscòpia. La fletxa indica la matriu a l'interior de la cànula. Durada aproximada: 5-10 minuts.</p>	 Aquesta imatge és un primer pla de l'implantació del constructe. Una mà amb guant blanc manipula una cànula artroscòpica. Una fletxa groga apunta a la matriu situada dins de la cànula, preparada per ser impactada a la superfície del cartílag articular. El fons mostra el camp quirúrgic amb draps estèrils.

En l'estudi es plantegen tres grups diferents de tractaments. El primer d'ells és el control negatiu, és a dir, una lesió generada artificialment sense cap tipus de tractament. El segon, és el control amb biomatriu sense cèl·lules. Per últim, el tercer grup està tractat amb el constructe desenvolupat amb CMMA provinents de cartílag articular autòleg colonitzades a la biomatriu de PLGA. La concentració cel·lular que s'utilitza està al voltant de $10E+06$ CMMA/cm³, ja que diversos autors afirmen que una concentració inferior a $10E+06$ CMMA/cm³ no aconsegueix produir una matriu cartilaginosa amb les característiques del cartílag hialí (Puelacher et al. 1994; LeBaron et al. 2000). El polímer presenta unes mides de 4 mm de diàmetre i 8 mm d'alçada, en canvi, acaba impactat i reduït a un cilindre de 3,5 mm de diàmetre i 5 mm d'alçada, així doncs queda un volum final de 0,2 cm³. Per tant, tenint en compte que només un 70-80% de les cèl·lules aconsegueixen entrar a dintre de la matriu, i es necessita una concentració mínima de $10E+06$ CMMA/cm³, es colonitza amb $3E+06$ CMMA per estar en el rang superior de cèl·lules que s'incorporen a la matriu i afavorir la colonització aproximadament de $2.1-2.4E+06$ CMMA. Aquests tres grups de tractament s'avaluen a dos temps diferents, 12 i 20 setmanes post-implantació, en 6

animals, així s'obtenen 12 mostres, una per a cada còndil medial de les dues extremitats posteriors, per tant, 4 mostres per a cadascun dels tres tractaments.

S'estableix un temps mínim de 12 setmanes perquè la matriu, tal i com s'ha observat anteriorment, triga uns 50 dies en perdre el 50% del seu pes. Aquesta degradació és essencial per a la integració del constructe en el seu nínxol i la remodelació d'aquest en funció de si hi ha regeneració o no. La degradació de la matriu ha de donar pas a la síntesi, per part de les CMMA, d'una matriu extracel·lular cartilaginosa que substitueixi la matriu. La distribució dels tractaments que s'aplica a cada còndil es resumeix a la taula 4.4. La nomenclatura dels animals (F-número) correspon a la utilitzada en l'estabulari del Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB. Quan es vol anomenar l'extremitat dreta, s'afegeix una D a la nomenclatura (per exemple: F12D) i en el cas de l'extremitat esquerra, s'afegeix una E (per exemple: F12E).

Taula 4.4. Tractaments aplicats als diferents animals de l'experiment pilot. Resum de les quantitats de CMMA colonitzades a les matrius de PLGA.

Ovella	Grup	Genoll esquerre (còndil medial)	Genoll dret (còndil medial)
F6	12 SETMANES	PLGA	PLGA + CMMA de cartílag articular 2.30 E+06
F12		Lesió sense tractar	PLGA + CMMA de cartílag articular 2.29 E+06
F14		PLGA	Lesió sense tractar
F16	20 SETMANES	PLGA + CMMA de cartílag articular 2.30 E+06	PLGA
F17		Lesió sense tractar	PLGA + CMMA de cartílag articular 2.30 E+06
F30		Lesió sense tractar	PLGA

Un cop transcorregut aquest temps, es realitzen les diferents anàlisis programades: una ressonància magnètica nuclear (RMN) per a valorar posteriorment si es pot correlacionar amb la valoració histològica, una RT-PCR d'algunes de les mostres, una radiografia, una analítica i per últim una avaluació macroscòpica i histològica (figura 4.25). La valoració de la regeneració del cartílag, a nivell macroscòpic, s'ha efectuat per part de traumatòlegs especialistes en lesions osteocondrals, mitjançant una artrotomia de les articulacions, immediatament després de l'eutanàsia. Els criteris per a l'avaluació macroscòpica han estat els criteris de l'escala ICERS de la

Internacional Cartilage Repair Society (ICRS) (van den Borne et al. 2007). Per avaluar el grau de reparació del cartílag articular a nivell histològic, els anatomatòlegs veterinaris han utilitzat el sistema de gradació recomanat per la ICRS (Mainil-Varlet et al. 2003), que estableix una escala on la puntuació mínima és 0 i la màxima 34.

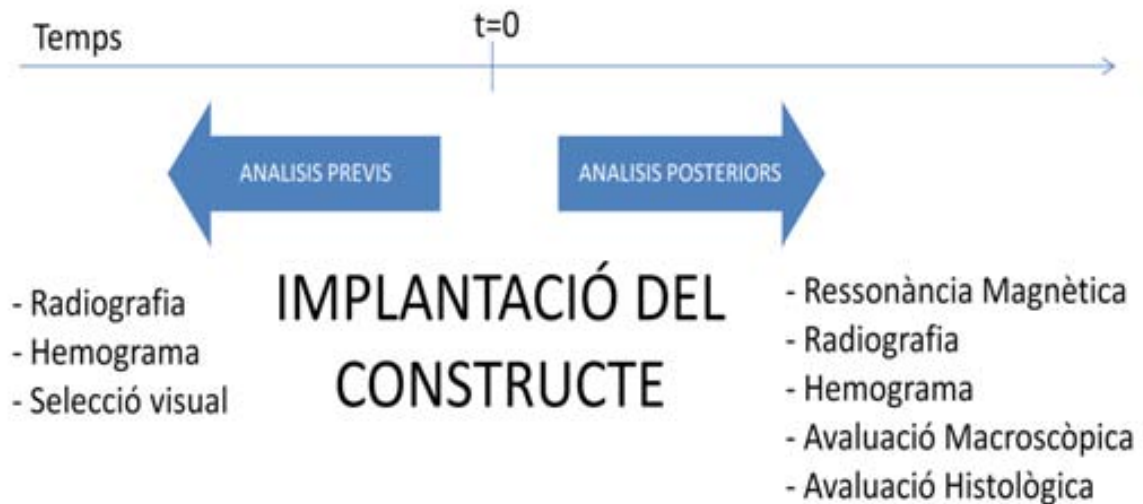


Figura 4.25. Anàlisis que es realitzen abans i després de la generació de la lesió i l'aplicació del tractament corresponent ($t=0$).

4.4.1. Resultats i discussió de l'experiment pilot.

Els resultats es presenten ordenats de forma seqüencial, es a dir, en primer lloc s'exposen els cultius realitzats per expandir les CMMA provinents del cartílag articular, i el procés fins arribar a la implantació dels constructes de PLGA amb CMMA, o el PLGA sol. L'apartat dels resultats post-eutanàsia es presenten segons les tècniques d'anàlisi realitzades, en primer lloc la RT-PCR i en segon lloc la valoració per subgrups d'anàlisi a 12 i 20 setmanes respectivament.

Tal i com s'ha mostrat a la taula 4.3, en primer lloc s'han extret 6 mostres de cartílag articular, però només s'han expandit les cèl·lules de 4 animals, un cop comprovat que les línies escollides no presentaven cap contaminació la primera setmana de cultiu. S'expandeixen 4 de les 6 mostres ja que només en 4 dels animals es tracten amb PLGA+CMMA de cartílag articular.

L'estratègia de cultiu consisteix en:

- 1- Aïllament de les CMMA a partir dels teixits obtinguts.
- 2- Expansió dels cultius fins arribar, com a màxim, al 80% de confluència de CMMA.
- 3- Ressebra dels cultius a $2-4E+03$ CMMA/cm² en funció del material disponible. En alguns casos no s'aconsegueix un nombre suficient de cèl·lules per poder sembrar a $4E+03$ CMMA/cm², llavors es sembra a 2 o $3E+03$ CMMA/cm² en funció de les cèl·lules disponibles en el moment de la ressebra.
- 4- Expansió dels cultius fins arribar a $6E+06$ CMMA totals.

La taula 4.5 resumeix els aspectes més rellevants relatius a l'expansió cel·lular. Les CMMA de cada línia germinal i de cada animal, en cada ressebra. Les CMMA de cada línia germinal i de cada animal van ser expandides tal i com s'indica a l'apartat 7.1, amb les diferents fases que inclouen l'extracció, aïllament, expansió i tripsinització.

L'expansió cel·lular es va portar a terme en condicions d'esterilitat i fou comprovada diàriament amb la visualització dels flascons de cultiu al microscopi. No es van observar signes de contaminació bacteriana o de llevats en cap dels cultius.

Equació 4.2. Duplicacions.

$$\frac{\text{Dies en cultiu}}{\left(\frac{\text{Dies en cultiu} \times 24 \times \ln 2}{\ln \left(\frac{\text{Densitat final}}{\text{Densitat de sembra}} \right)} \right)}$$

Equació 4.3. Temps de duplicació.

$$\frac{\text{Dies en cultiu}}{\text{Duplicacions}} \times 24$$

Una vegada les cèl·lules passen de la morfologia esfèrica que presenten un cop disgregades del teixit (taula 4.6. punt 2) i adquireixen la morfologia fibroblàstica requerida per ser considerada CMMA, és llavors quan es pot ressebrar amb una densitat inicial amb la que es pot iniciar el càlcul de les duplicacions totals i el temps de duplicació. Aquests càlculs es realitzen mitjançant les equacions 4.2. i 4.3.

Taula 4.5. Expansió cel·lular dels cultius establerts per a la realització de la prova pilot de l'assaig preclínic. Sembrar_i: Densitat inicial a la que es va sembrar les cèl·lules; Densitat_f: Densitat final.

Ovella	Ressebra	Sembrar _i (CMMA/cm ²)	Densitat _f (CMMA/cm ²)	Temps de duplicació (hores)	Duplicacions
F6	Primera	4.00E+03	3.26E+04	63.43	3.03
F12		4.00E+03	3.16E+04	64.38	2.98
F16		4.00E+03	5.60E+04	50.42	3.80
F17		4.00E+03	3.60E+04	60.56	3.17
F6	Segona	4.00E+03	4.65E+04	47.59	4.54
F12		2.00E+03	1.91E+04	66.35	3.25
F16		2.00E+03	5.60E+04	34.94	4.81
F17		2.00E+03	2.84E+04	43.88	3.82
F6	Tercera	3.00E+03	4.16E+04	50.61	3.79
F12		3.00E+03	2.64E+04	61.19	3.14
F16		3.00E+03	3.52E+04	40.53	3.55
F17		3.00E+03	2.40E+04	48.00	3.00
F6	Quarta	4.00E+03	4.08E+04	57.30	3.35
F12		4.00E+03	3.10E+04	64.99	2.95
F16		2.00E+03	4.24E+04	38.12	4.41
F17		2.00E+03	4.16E+04	38.36	4.38
F16	Cinquena	4.00E+03	5,48E+04	44.49	3.77
F17		4.00E+03	4.24E+04	49.32	3.40

Els cultius corresponents a les ovelles F16 i F17 presenten una cinquena ressebra perquè són les dues ovelles que es van implantar més tard, amb una setmana de diferència amb les ovelles F6 i F12. Dels 4 cultius primaris cap d'ells va presentar contaminació durant el període d'expansió, fet corroborat mitjançant l'observació diària al microscopi. Per tant, es considera que

l'estratègia d'aïllament i expansió és segura i robusta ja que un 100% dels cultius van mantenir l'esterilitat i es van poder expandir correctament.

El procés d'aïllament i expansió ha estat robust en tots els casos, tal com es mostra a la taula 4.11, on els temps de duplicació es situen en un rang entre 38 i 64 hores. Al capítol 3 ja s'ha determinat que la sembra de condrocits a $5E+03$ CMMA/cm² presenta un temps de duplicació de 2.17 dies, és a dir, 51 hores, valor que es troba dintre del rang que s'ha observat en aquestes expansions per a l'experiment pilot.

Els constructes que es preparen, mitjançant la colonització de les biomatrius de PLGA per part de les CMMA expandides anteriorment. Per a les ovelles de les 12 setmanes (F6 i F12) portaven cèl·lules que havien realitzat entre 12 i 14 duplicacions (4 ressembres) i les ovelles de les 20 setmanes (F16 i F17) havien realitzat entre 17 i 20 duplicacions (5 ressembres). Aquesta diferència és deguda a que la introducció va ser posterior en les ovelles destinades a 20 setmanes, ja que no era logísticament possible realitzar 6 artroscòpies d'ovella en una sola jornada. En cap cas aquest fet es tradueix en aberracions cromosòmiques o alteracions genètiques, ja que en estudis previs s'han cariotipat les CMMA de cartílag durant la primera i la quinta ressembla, sense mostrar cap diferència, sent els dos tipus cel·lulars idèntics en càrrega cromosòmica. Altres estudis també han demostrat que l'expansió de llarga duració no altera l'estabilitat cromosòmica (de la Fuente et al. 2004) ni l'estabilitat genètica (Neri et al. 2011).

Un cop expandides totes les línies cel·lulars i amb la informació de les densitats finals, es van portar a terme les colonitzacions d'acord amb el protocol establert a l'apartat 7.7.1., sense trobar presència d'agregats de CMMA ni contaminació durant les 24 hores prèvies a la introducció en l'animal. Es va realitzar una ressembla posterior en paral·lel a la colonització per determinar si durant el procés de colonització s'havia generat alguna contaminació i en cap cas es va observar signes visibles de contaminació bacteriana o fúngica. A la taula 4.6. es mostren les quantitats de CMMA que es van introduir en cada matriu de les que es van implantar en les ovelles. Com es pot observar, dels $3E+06$ CMMA que es posen a colonitzar, tal i com s'ha vist en els experiments previs, només un 76.7% colonitzen la matriu, tal i com ocorre en 3 de les 4 matrius, ja que l'última d'elles (F17) presenta un 86.7% de colonització.

Taula 4.6. Resum de les quantitats i les característiques (duplicacions i dies de cultiu) de les CMMA colonitzades a les matrius de PLGA. La quantitat de cèl·lules per matriu i el tant per cent de colonització que s'obté a partir de $3E+06$ cèl·lules.

Ovella	Extremitat	Dies de cultiu totals/Duplicacions	Cèl·lules/matriu	% Colonització
F6	Genoll dret	43/14.7	2.30E+06	76.7%
F12	Genoll dret	43/12.3	2.29E+06	76.3%
F16	Genoll esquerre	48/20.3	2.30E+06	76.7%
F17	Genoll dret	48/17.7	2.60E+06	86.7%

Així doncs, el procés, fins al moment de la implantació, es porta a terme correctament i els resultats són satisfactoris, ja que no hi ha hagut contaminacions, totes les línees cel·lulars s'han pogut expandir sense problemes i les colonitzacions han tingut un rendiment d'un 79.1% de mitjana, tal i com s'havia determinat prèviament (al voltant del 80%). Finalment, la realització dels implants es va portar a terme en dos torns, amb una setmana de dilació entre ells, ja que realitzar més de 6 artroscòpies en un dia resulta excessivament llarg i complex, de forma que es van realitzar 3 animals a cada sessió. Pel que fa a les artroscòpies de generació de les lesions, totes es van realitzar correctament, aproximadament a la part central de la superfície de contacte del còndil medial (figura 4.26), encara que en algun cas la lesió es va realitzar en una posició massa lateral (F14D). En aquest cas, la matriu es va implantar i no va quedar del tot subjecte per la paret latero-medial, encara que com es conclou als resultats, la matriu es va mantenir fixada.

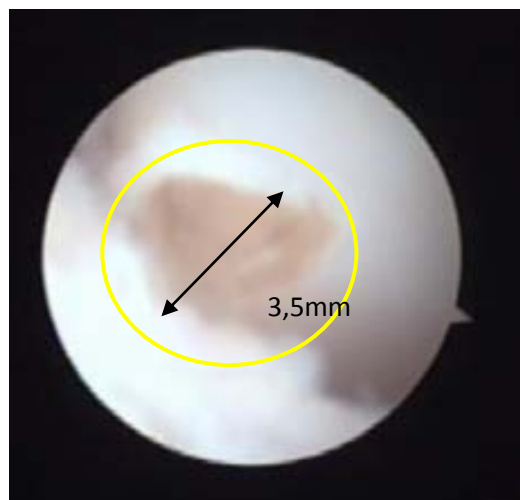


Figura 4.26. Imatge del vídeo de l'artroscòpia on es pot observar en detall la lesió generada (encerclada en groc).

No es va realitzar cap tipus de contenció mecànica i les ovelles van començar a caminar en el moment en que van recuperar la consciència. Durant les següents setmanes van restar sota la supervisió del servei de Granges Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb controls i visites regulars per part del veterinaris. Transcorregudes les 12 i 20 setmanes es van eutanasiar els animals i es van realitzar les anàlisis i avaluacions detallades a la figura 4.25.

El primer dels anàlisis que es realitza a les mostres de l'experiment pilot és el molecular. En l'anàlisi de la condrogènesi, per RT-PCR, s'ha utilitzat com a control positiu de l'estat i la qualitat de l'ARN extret la proteïna β -actina. La β -actina es una proteïna altament conservada que s'expressa en grans quantitats a totes les cèl·lules eucariòtiques. Forma part del citoesquelet i està involucrada en la motilitat cel·lular, mitosis i la contracció muscular (Kost et al. 1983). Es varen realitzar anàlisis per a diferents gens implicats en la condrogènesi, tals com el col·lagen tipus II, tipus I i l'Aggrecan. El teixit que es va utilitzar per realitzar l'anàlisi va ser el de la zona lesionada, i reparada o regenerada amb els tractaments aplicats. En el moment de l'autòpsia dels animals per a la recollida de mostres, amb un bisturí es va retallar una de les parts laterals de la zona lesionada. A la figura 4.27 es mostren els resultats obtinguts.

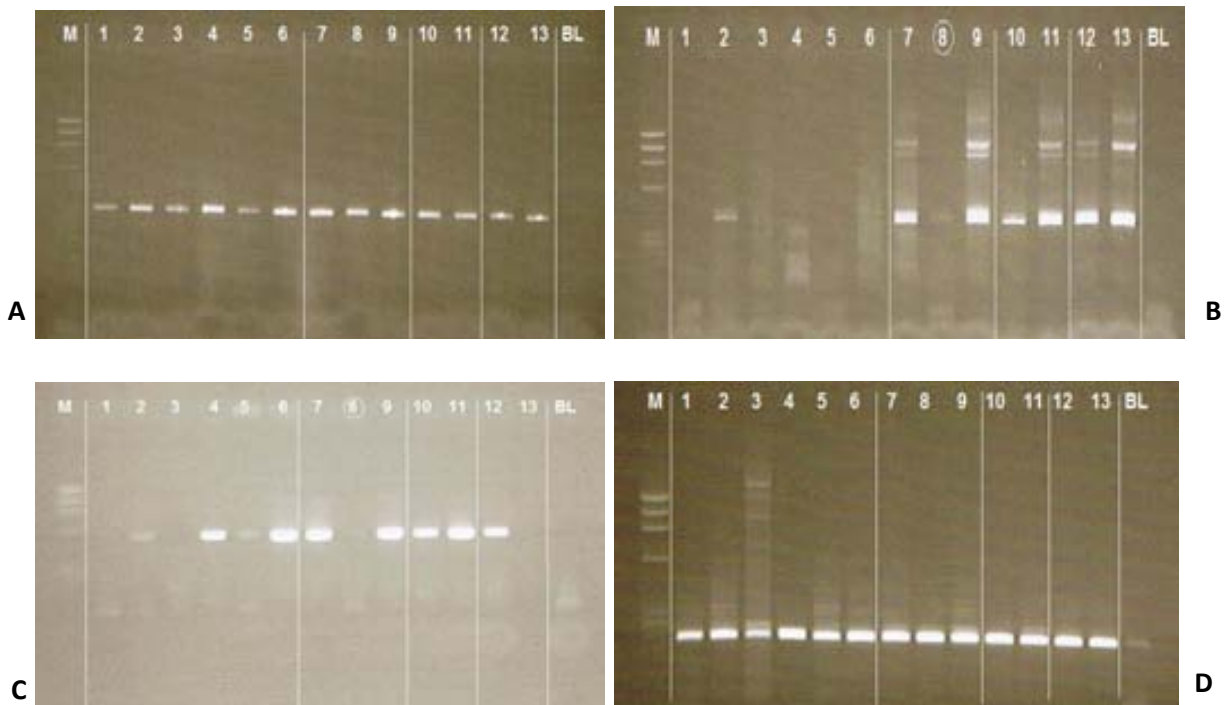


Figura 4.27. Resultats de l'estudi d'expressió gènica per RT-PCR per A: β -actina ; B: Col·lagen I ; C: Col·lagen II ; D: Aggrecan. Carrils: M: Marcador de pes molecular; 1-6,8: Controls positius (cartilag hialí); 7, 9: PLGA+CMMA; 10,11: PLGA; 12,13: Lesió sense tractar.

Els resultats (taula 4.7) mostren l'expressió gènica dels principals marcadors condrogènics, col·lagen tipus II i aggrecan, positiu per a totes les mostres per igual, exceptuant alguns controls positius en el cas del col·lagen II (figura 4.27-C). Per una altra banda, l'expressió del col·lagen tipus I no és característic del cartílag hialí, tal i com es mostra en els controls positius de cartílag hialí ovi, on resulta negatiu, en canvi, a les mostres on s'han aplicat els tractaments, existeix expressió d'aquest marcador.

El col·lagen tipus I és característic del teixit ossi o el cartílag fibrós, així que es pot pensar en una petita contaminació de teixit ossi en el moment de la recollida de la mostra, ja que l'espessor del cartílag a les ovelles de l'experiment varia entre 1-1.5 mm i resulta molt complicat no agafar teixit ossi subcondral.

Taula 4.7. Resum dels resultats de les RT-PCR realitzades a mostres representatives de cada variable estudiada i control (cartílag hialí ovi).+=Banda poc intensa; +=Banda intensa;*=S'observen altres bandes)

Animal/Tractament			β -actina	Col·lagen I	Col·lagen II	Aggrecan
F6	Genoll dret	PLGA+CMMA	+	+	++	+
	Genoll esquerre	PLGA	+	+	++	+
F14	Genoll dret	Lesió	+	+	++	+
F17	Genoll dret	PLGA+CMMA	+	+	++	+
F30	Genoll dret	PLGA	+	+	++	+
	Genoll esquerre	Lesió	+	+	++	+
	Control + (cartílag hialí)		+	-	++	+

Aquest anàlisi no aporta cap informació significativa, ja que no mostra diferències entre els diferents tractaments aplicats. Es podria millorar l'anàlisi amb una precisió major al prendre la mostra i també utilitzant una PCR quantitativa, ja que l'anàlisi que s'ha realitzat simplement ens mostra si s'expressa o no el gen analitzat, però no en quina quantitat. Les mostres histològiques

que s'han processat després de la pressa de mostra per a PCR han resultat bastant danyades en gran part de la seva superfície.

Adicionalment es va realitzar un estudi radiològic passades les 12 i 20 setmanes post-implantació del constructe, per a cada animal. Tant en la projecció radiogràfica latero-lateral com a la antero-posterior, no s'observaren signes d'alteracions patològiques (figura 4.28) en cap dels animals de l'estudi.

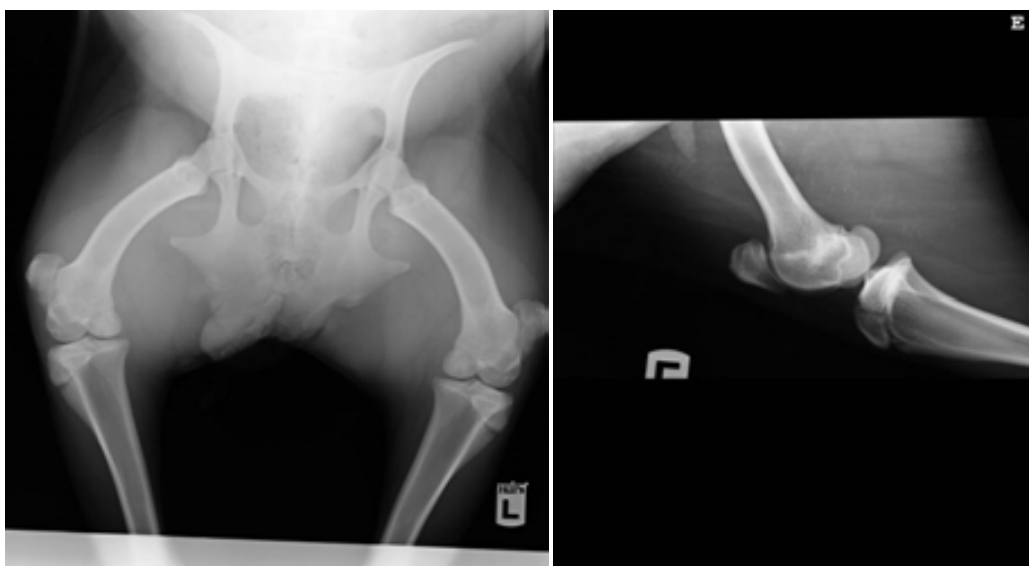


Figura 4.28. Projeccions anteroposterior (esquerra) i laterolateral (dreta) de les articulacions femoropatel·lars, obtingudes per radiografia, de l'animal F12.

En última instància, es presenten els resultats d'anatomia patològica, anàlisi histològic, avaluació macroscòpica i RMN en una sèrie d'exposicions en que els resultats es troben ordenats en base als tractaments aplicats a cada defecte osteocondral. En cada cas s'analitza l'aspecte macroscòpic, la histologia i la imatge que presenta en la RMN, i es presenten per a cada animal i per a cadascuna de les articulacions femorotibial, descrivint el cartílag articular del còndil medial i lateral per separat, ja que el tractament administrat va ser diferent. Per a l'avaluació dels resultats, l'especialista anatomopatòleg ha utilitzat un dels primers sistemes de gradació per a l'avaluació histològica de la regeneració (Mainil-Varlet et al. 2001) i un sistema d'avaluació elaborat per Brittberg i Peterson (van den Borne et al. 2007) anomenat escala ICRS (Internacional Cartilage Repair Society). A l'apartat 7.8.1 es descriu tant el sistema de gradació macroscòpic com

histològic, amb les taules d'avaluació corresponents (taula 7.9 i 7.11). Per sistematitzar la descripció histològica, es divideix l'àrea de la lesió d'estudi per zones (figura 4.29), on hi ha dos grans territoris, el superficial (S) corresponent al cartílag i el profund (D) corresponent a l'os subcondral. La numeració correspon a la zona de la lesió (1), adjacents (2) o profundes (3).

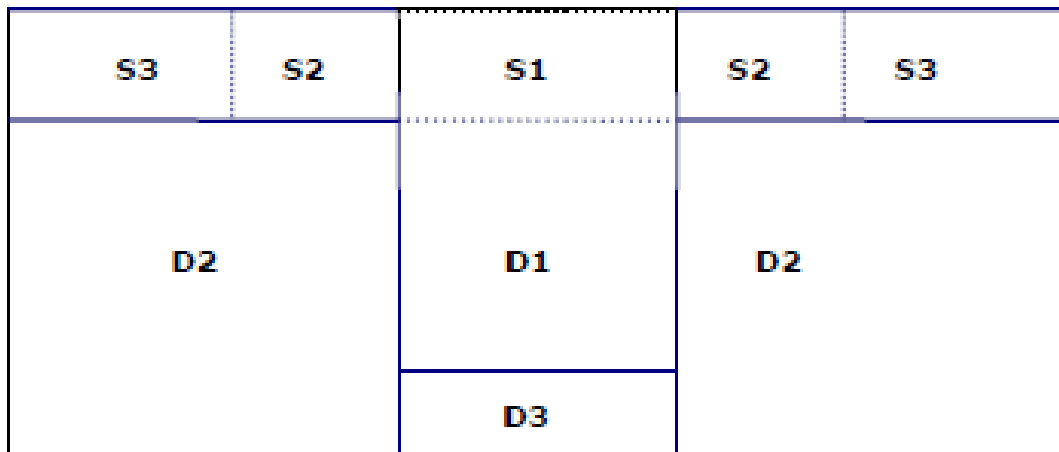


Figura 4.29. Esquema de les zones divisòries virtuals en les que s'ha dividit el cartílag per a realitzar la descripció histològica. S: Zona superficial; D: Zona profunda.

4.4.1.1. Grup de lesió osteocondral tractada amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de cartílag articular hialí.

El primer dels grups que es discuteix és el dels tractaments amb biomatriu colonitzada amb cèl·lules, sacrificats a les 12 setmanes (F6D i F12D). Una de les lesions d'aquest grup (F6D-Figura 4.30-B) presenta una zona de mida petita, discretament deprimida, amb un fons hiperèmic, que en els seus marges mostra una bona integració amb el teixit adjacent. En l'altra mostra (F12D-Figura 4.30-C) s'observa una lesió deprimida de major diàmetre que l'anterior, amb un fons de color blanquinós, marcadament granular, on el cartílag adjacent mostra una marcada irregularitat amb la presència d'algunes fissures. Així la valoració macroscòpica que s'obté és 10/12 en el cas d'F6D i 6/12 en F12D.

A la figura 4.30-D-E es pot observar l'aspecte microscòpic que presenta el teixit regenerat. La zona S3 mostrava en tots els casos una àmplia capa de cartílag hialí amb intensa positivitats de

la tinció amb safranina. L'àrea S1, la zona de la lesió, mostra una morfologia característica de cartílag hialí amb densitat cel·lular elevada, sense organització columnar, tinció de safranina positiva i marcada irregularitat del límit entre cartílag i os (línia de marea). El territori corresponent al cartílag articular estava constituït en la pràctica totalitat del gruix per cartílag hialí, a excepció d'una estreta franja superficial formada per teixit conjuntiu no especialitzat, un patró similar al del cartílag normal adjacent. El teixit perilesional de F12D mostra en el territori D1 una extensa acumulació de vasos sanguinis de diferents mides, edema i focus d'aspecte mixoide que no es corresponen amb reparació del cartílag, sinó més una diferenciació d'aquest cap a fibrocartílag o teixit ossi. S'observa extensa integració entre les zones D1 i D2 en tots els casos.

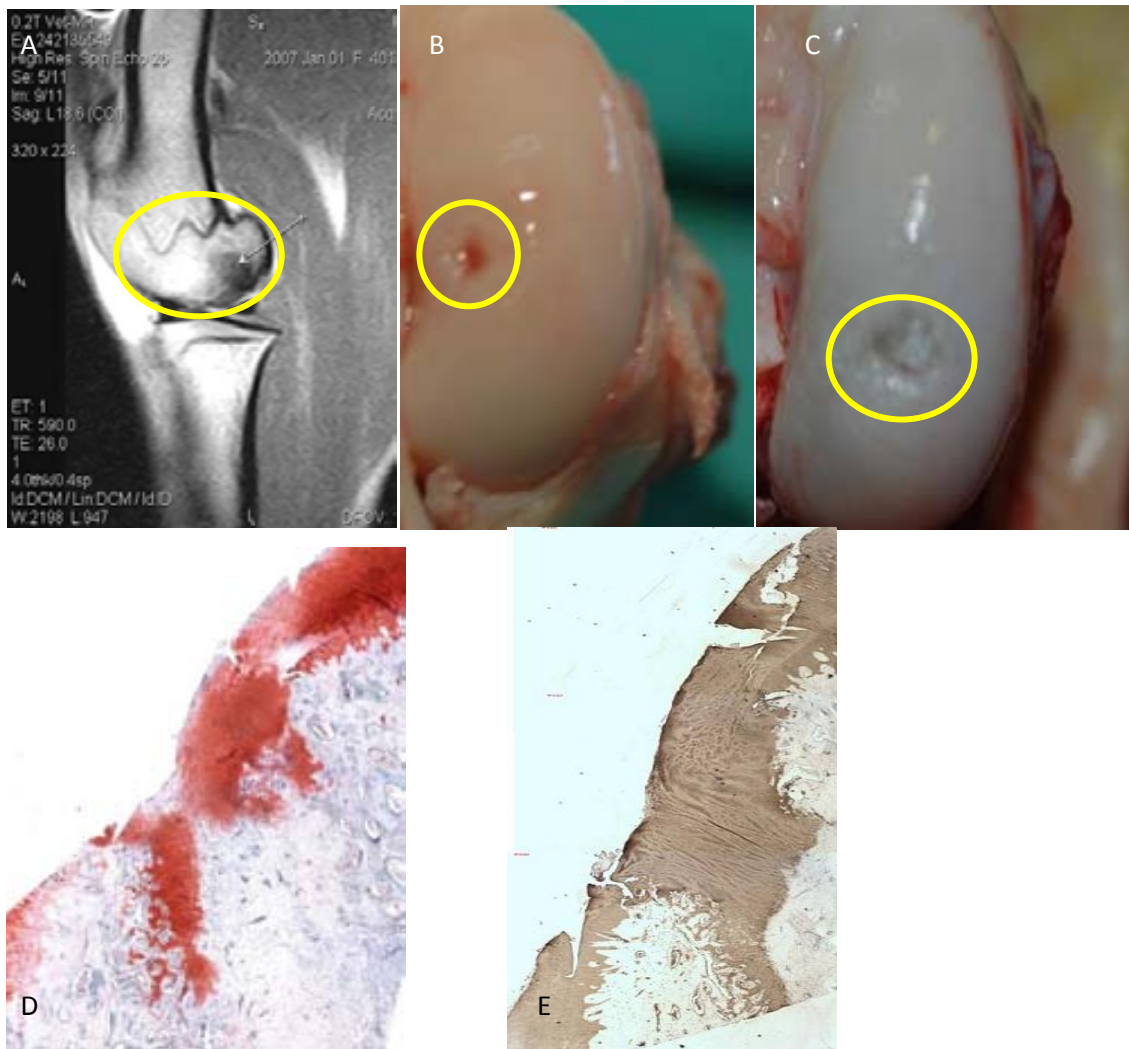


Figura 4.30. Resultats corresponents als còndils medials tractats amb matriu de PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular, a les 12 setmanes post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F6D (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F6D i F12D respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F6D) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament.

A l'anàlisi de la RMN, en el centre d'aquesta lesió (figura 4.30-A) s'observa una imatge puntiforme (3mm de diàmetre aprox.), caracteritzada per isosenyal T1, hiposenyal T2 (en comparació al senyal de l'os subcondral adjacent a la lesió) i alta senyal *Short TI Inverse Recovery* (STIR) que podria correspondre a restes de la matriu reabsorbible implantada (F6D), així com cert edema ossi associat. Les característiques de senyal de la zona de reparació del defecte són compatibles amb teixit d'estirp fibrocartilaginós i esclerosi subcondral. En el cas de F12D les característiques de senyal de la zona de reparació del defecte són compatibles amb teixit d'estirp fibrocartilaginós i esclerosi subcondral perilesional així com importants lesions d'alta senyal STIR probablement corresponent a un marcat edema ossi associat. La senyal STIR és un bon indicador de dany muscular i pot ser útil en la detecció d'esclerosi i edema ossi associat a aquestes lesions osteocondrals. Aquest edema pot estar relacionat amb la reabsorció de la matriu. En les seccions realitzades, no s'observen entre l'implant i l'os subcondral així com amb el cartílag natiu defectes de la superfície ni zones d'ompliment amb líquid sinovial, suggestives d'erosió de la superfície articular, de manera que es pressuposa una correcta integració de l'implant.

Pel que fa als animals sacrificats a les 20 setmanes (F16E, F17D), de les lesions tractades amb biomatrius de PLGA colonitzades amb CMMA, la mostra F17D presenta una molt discreta depressió a la zona de lesió que es troba envoltada per una àrea en la qual el cartílag articular presenta una superfície articular llisa, amb una bona integració amb el teixit circumdant i normocolorada. L'altra mostra (F16E) ha degenerat en una lesió crateriforme, més deprimida que la descrita dins d'aquest mateix grup. La valoració macroscòpica és la més alta de totes les mostres avaluades, amb una puntuació de 11/12 en el cas d'F17D i 9/12 en F16E.

A la figura 4.31-D-F s'observa que en el territori D1 corresponent a l'os subcondral, les lesions tractades amb matrius colonitzades, mostren la presència de teixit ossi esponjós que contenen àrees d'osteosíntesi considerablement actives. El territori S1 de la lesió en matrius colonitzades mostra la presència de cartílag hialí amb certa irregularitat en el seu gruix, sense una clara organització en capes i amb la presència de teixit fibrós en les zones més superficials. El nivell de la superfície articular es manté respecte al cartílag adjacent, però la línia de marea és irregular. En les seccions corresponents a lesions tractades amb matrius colonitzades avaluades a les 20 setmanes s'observa positivitats al col·lagen II a tota la superfície de la zona S1. La lesió F16E mostra la presència d'extens teixit conjuntiu, amb absència de teixit ossi en D1, i que arriba a

la superfície corresponent a S1 sense la presència de cartílag hialí, recordant a una lesió control. Per tant, la puntuació obtinguda a la valoració histològica per a cada lesió és de 27/32 per F17D i 13/32 per a F16E. A les seqüències de RMN de la lesió F16E, on s'han descrit unes característiques histològiques i macroscòpiques no corresponents a cartílag hialí, s'observen lleugers artefactes ferromagnètics per intervenció quirúrgica amb una imatge d'una lesió gran de morfologia heterogènia. Aquesta lesió de marges mal definits presenta marges escleròtics i s'estén fins a la unió metàfisi-epifisària. Les característiques de senyal de la zona de reparació del defecte són compatibles amb teixit d'estirp fibrocartilaginós i esclerosi subcondral perilesional. L'amplitud i heterogeneïtat de la lesió impedeix una valoració i visualització correcta de la integritat de l'implant a causa de la presència d'acusats canvis edematosos i inflamatoris. Aquestes troballes en el diagnòstic diferencial per imatge podrien correspondre a una àmplia zona de necrosi avascular del còndil femoral o a canvis edematosos i inflamatoris associats al implant o la tècnica quirúrgica.

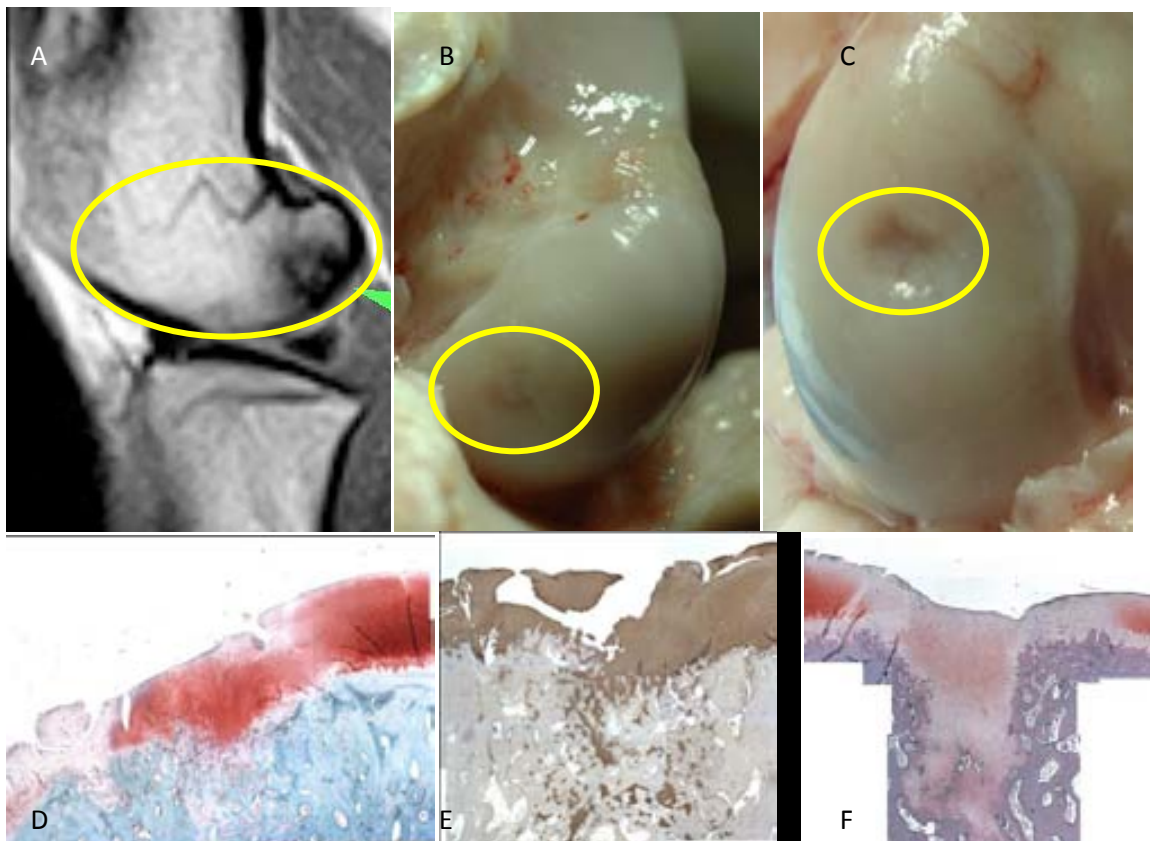


Figura 4.31. Resultats corresponents als còndils medials tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular, a les 20 setmanes post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F17D (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F17D i F16E respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F17D) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament; F: Imatges d'histologia (F16E) corresponents a Safranina O.

Per altra banda, a la mostra F17D, la imatge (figura 4.31-A) podria correspondre a restes de la matriu reabsorbible implantada envoltada d'esclerosi òssia a nivell subcondral així com teixit, que per les seves característiques de senyal, pot correspondre a fibrocartílag, que entapissa la zona del defecte. S'observa una correcta integració de l'implant a causa de la manca de visualització de zones d'ompliment anòmales amb líquid sinovial.

El marcatge immunohistoquímic amb l'anticòs anti-sox9 mostra les cèl·lules del cartílag hialí tenyides positivament (cèl·lules amb citoplasma negre a la figura 4.32-B). En totes les mostres, el marcatge s'observa en les cèl·lules més superficials del territori S3 i en els clústers del territori S2 (figura 4.37). En les lesions tractades amb matrius colonitzades s'observen cèl·lules positives en l'espessor de la capa S1 i també a la "zona de col·lisió" localitzada entre la regió basal del cartílag de superfície, l'os regeneratiu de la zona subcondral i una àrea residual de teixit conjuntiu subcondral (figura 4.32-A). És en aquesta última localització on es troba una gran activitat osteoblàstica que pot correspondre a la font de cèl·lules provinent del moll d'os amb la capacitat condrogènica per a generar nou cartílag a través de la ossificació endocondral.

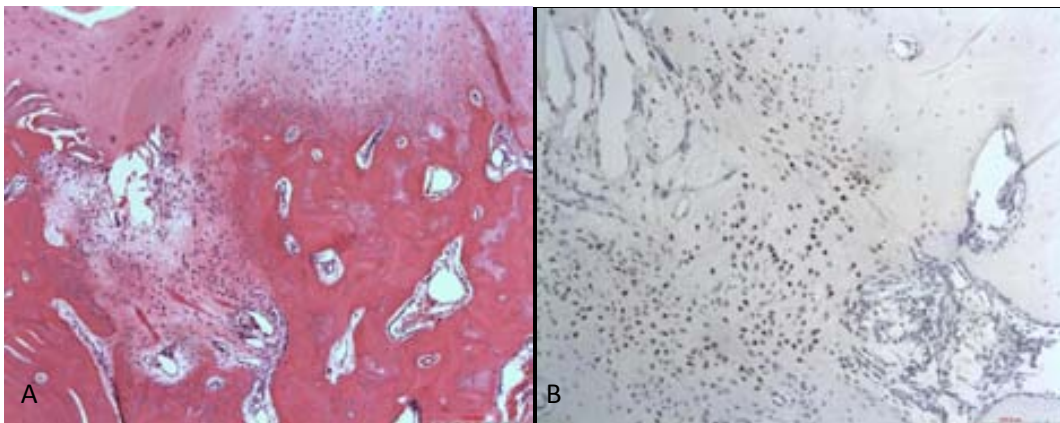


Figura 4.32. Resultats corresponents als còndils medials tractats amb matriu de PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular a les 20 setmanes (F17D). A: Imatge d'histologia corresponents a Hematoxilina Eosina (A) i Immunohistoquímica de Sox9 (B).

4.4.1.2. Grup de lesió osteocondral tractada amb biomatriu PLGA sense CMMA.

El segon grup que s'analitza és el de lesions tractades amb biomatriu de PLGA no colonitzada. A la figura 4.33 s'observen les lesions a nivell macroscòpic dels animals sacrificats a

les 12 setmanes (F6E, F14E), que presenten una àrea llisa, discretament deprimida, respecte al cartílag adjacent, amb una perfecta continuïtat amb el mateix, sense fissures ni solucions de continuïtat, resultant amb una puntuació a la valoració macroscòpica de 9/12 en el cas d'F6E i 3/12 en F14E. A nivell histològic (figura 4.33-D-F) s'observa la presència de cartílag hialí a la zona més profunda de la capa S1, mentre les zones mitjanes i superficials estan constituïdes per teixit conjuntiu dens, amb la presència d'alguns vasos sanguinis. Un dels aspectes més sorprenents en aquest sentit és la presència de cèl·lules, i amb una densitat normal o superior a la que correspon a l'os. La procedència d'aquestes cèl·lules pot venir de diversos llocs com de la sinòvia o del propi moll de l'os subcondral que s'ha perforat, donant un sagnat que allibera gran quantitat de cèl·lules absorbides per al matriu. Es va observar una extensa integració entre les zones D1 i D2 en tots els casos analitzats fins ara, excepte en F6E (figura 4.33-F) en el qual existia una neta delimitació entre els territoris D1 i D2, amb tan sols integració focal.

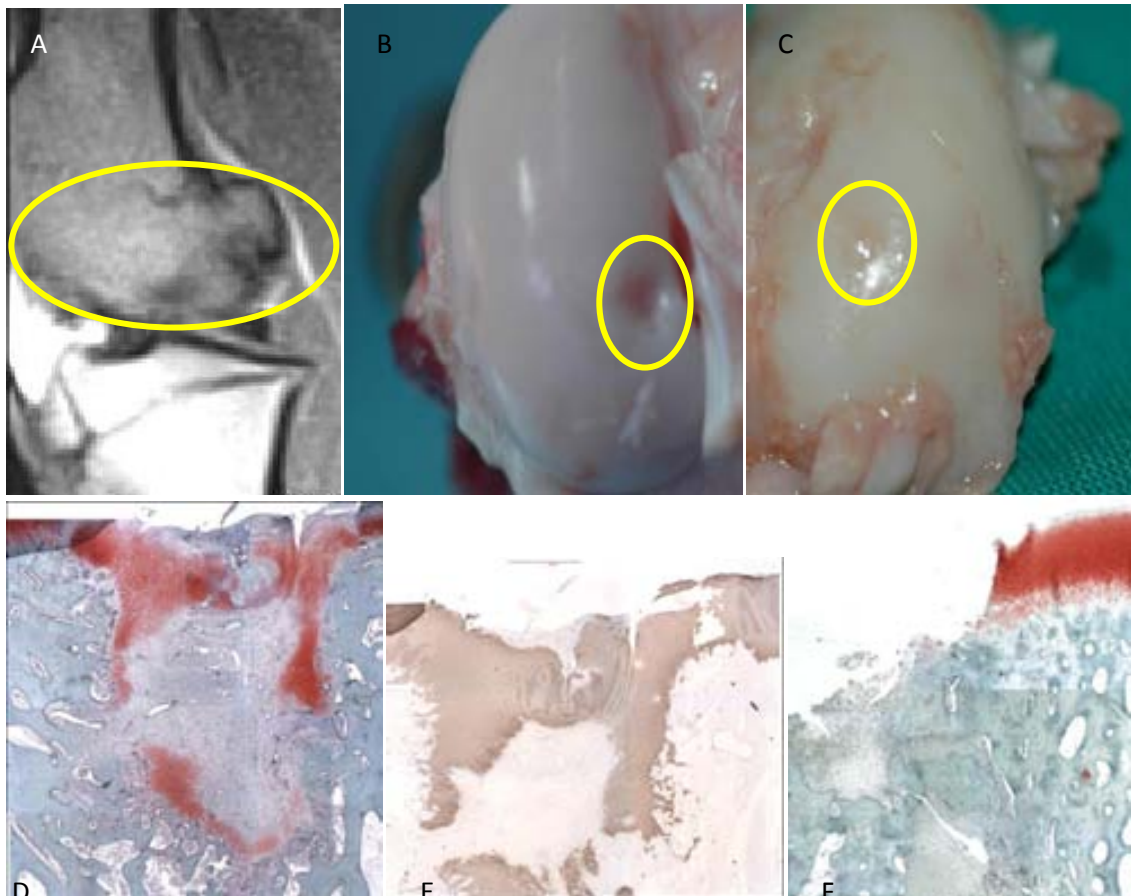


Figura 4.33. Resultats corresponents als còndils medials tractats amb PLGA sense CMMA, a les 12 setmanes post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F14E (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F6E i F14E respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F14E) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament; F: Imatges d'histologia (F6E) corresponents a Safranina O.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, durant la cirurgia de F14E, no es va centrar la lesió i la possible manca de paret lateral podria explicar la no visualització de la matriu a causa d'una pèrdua de l'implant. A nivell de RMN podria explicar la manca de reactivitat de l'os perilesional amb absència d'esclerosi, edema i senyal compatible amb l'implant. Al centre d'aquesta lesió (figura 4.33-A) s'observa una imatge puntiforme (2 mm de diàmetre aproximat), caracteritzada per isosenyal T1 i hiposenyal a la resta de les potenciacions (en comparació al senyal de l'os medullar adjacent a la lesió) que podria correspondre a restes de la biomatriu de PLGA reabsorbible implantada.

Respecte a la integració de l'implant, s'observa una manca de continuïtat entre l'os subcondral/cartílag nadiu amb l'implant, evidenciada per una línia en hipersenyal STIR que envolta a una petita imatge triangular de 4 mm de longitud que podria correspondre a l'implant. Aquestes troballes suggereixen la manca d'unió, almenys de forma parcial, de l'implant a l'os subcondral.

Pel que fa als animals sacrificats a les 20 setmanes del grup de lesions tractades amb matrius de PLGA sense colonitzar amb CMMA, ambdues lesions (F16D i F30D), van mostrar un aspecte similar que a les 12 setmanes, amb un discret augment en el diàmetre de la zona deprimida (figura 4.34-B-C) i en un dels casos amb irregularitat del cartílag adjacent (F16D), obtenint una valoració macroscòpica de 8/12 en el cas d'F16D i 9/12 en F30D. A nivell histològic s'observa un patró caracteritzat per la presència de cartílag hialí en les capes profundes i de teixit fibrós en les superficials de la zona de la lesió S1. La superfície articular es troba deprimida respecte al teixit cartilaginós adjacent i la línia de marea és regular. En els altres grups, el marcatge immunohistoquímic en el teixit superficial va ser menys intens i més irregular que el descrit a les matrius colonitzades amb CMMA. Així mateix, s'observen àrees positives a la tinció de Safranina O (figura 4.34D,F) i al col·lagen II (figura 4.34-E) en zones corresponents a ossificació endocondral de l'os subcondral, especialment en el territori D3. La tinció de Safranina O va ser més intensa a la zona basal de la zona S1 de la lesió, obtenint una puntuació a la valoració histològica de 26/32 per a F16D i 25/32 per a F30D. La imatge de RMN, a la figura 4.34-A, correspon a la mostra F16D que presenta una lesió de morfologia pseudonodular amb una senyal STIR lleugerament alta, compatible amb edema ossi. Respecte a la integració de l'implant no s'observen imatges que suggereixin la manca d'unió en les seccions realitzades encara que si alguna irregularitat i augment de senyal del cartílag en aquest punt.

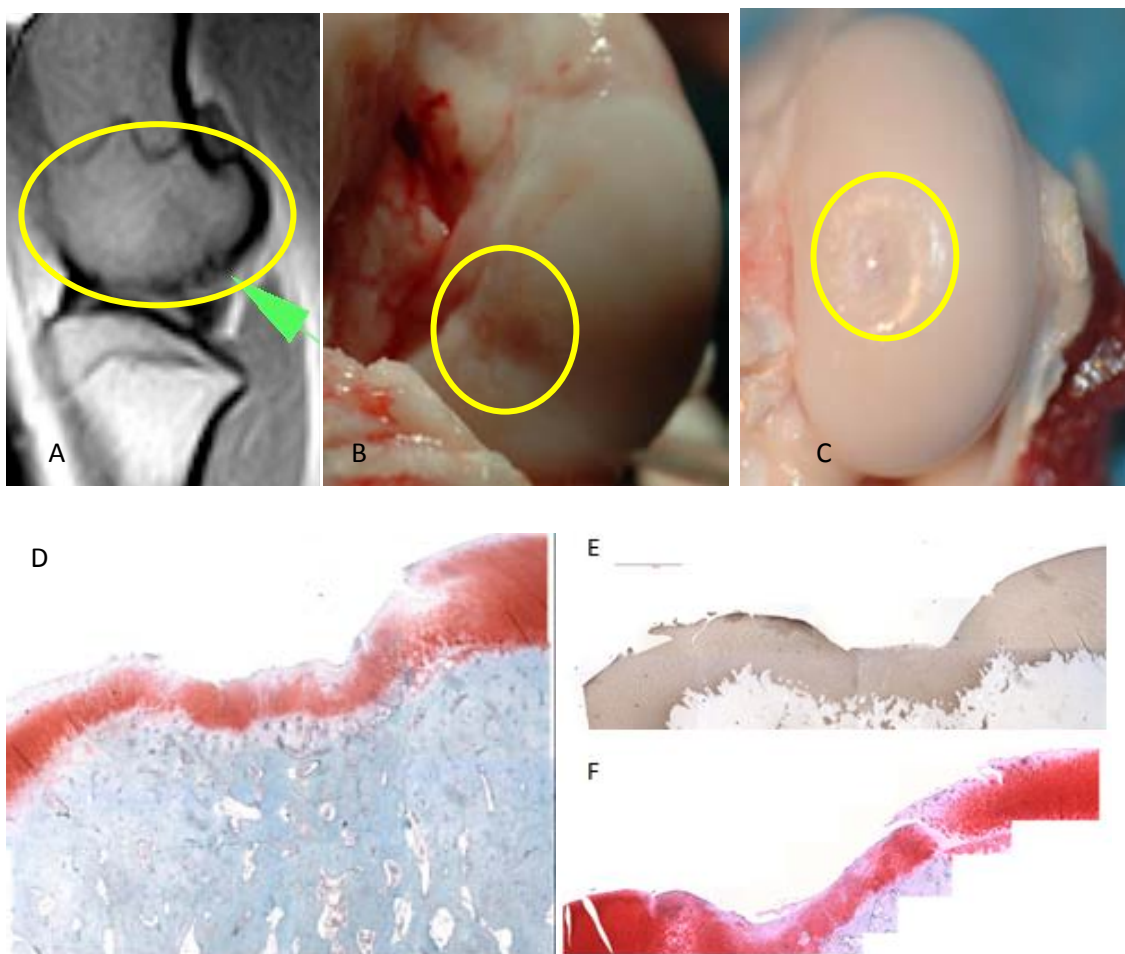


Figura 4.34. Resultats corresponents als còndils medials tractats amb PLGA sense les CMMA, a les 20 setmanes post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F16D (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F16D i F30D respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F30D) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament; F: Imatges d'histologia (F16D) corresponents a Safranina O.

4.4.1.3. Grup de lesió osteocondral control sense tractament.

L'últim grup que s'analitza és el control negatiu, és a dir, les lesions no tractades. Pel que fa als animals sacrificats a les 12 setmanes (F12E, F14D) a nivell macroscòpic (figura 4.35.B-C) s'observa una erosió profunda del cartílag articular que arribava al nivell de l'os subcondral subjacent. A la zona perilesional s'observa una marcada irregularitat de la superfície articular, amb profundes fissures del cartílag. Així la puntuació és la pitjor de totes les mostres que s'analitzen amb una valoració macroscòpica de 3/12 en el cas d'F12E i 4/-12 en F14D. Pel que fa a la valoració histològica, una de les mostres no es va poder analitzar ni avaluar perquè no es va realitzar correctament el tractament de descalcificació. En canvi, la mostra F14D si es va analitzar i

es troba que en absència de tractament, l'avaluació microscòpica mostra el territori de la lesió S1 constituït en gran part per teixit conjuntiu, cartilaginós i focalment ossi. En les seccions histològiques estudiades, corresponents a diferents mostres a les 12 setmanes de la lesió, el territori D1 està constituït per un teixit conjuntiu lax, no especialitzat, però en el cas de les lesions no tractades mostra un patró menys cohesiu. La puntuació que s'obté a la valoració histològica és de 9/32 per a F14D

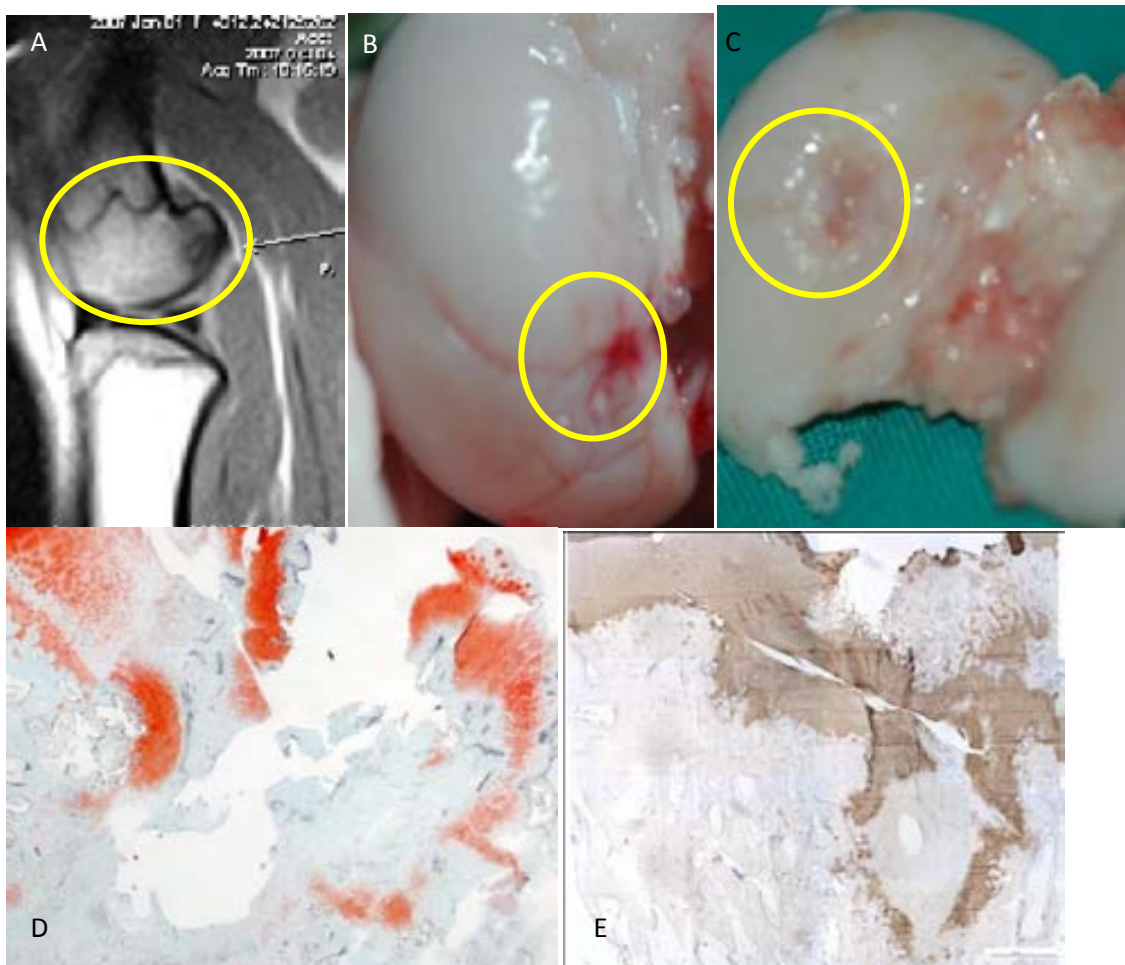


Figura 4.35. Resultats corresponents als còndils medials amb lesió no tractada a les 12 setmanes (lesió control) post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F12E (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F12E i F14D respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F14D) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament.

La RMN mostra que la superfície de la zona intervinguda, en F12E, presenta una depressió que afecta cartílag i os subcondral (figura 4.43.A) compatible amb lesió osteocondral

d'aspecte crònic (hiposenyal STIR) amb esclerosi perifèrica que es correspon a lesió realitzada per l'estudi. La mostra F14D també presenta una depressió que afecta cartílag i os subcondral (geoda) compatible amb lesió osteocondral d'aspecte crònic encara que amb mínimes zones d'edema ossi (hipersenyals STIR) i marcada esclerosi perifèrica que es correspon a la lesió realitzada.

Per últim, s'avaluen les lesions control no tractades i analitzades a les 20 setmanes (F17E i F30E). Macroscòpicament, aquest subgrup mostra un marcat enfonsament de la zona lesionada que presenta un fons irregular d'aspecte fibril·lar. El cartílag articular adjacent no mostra alteracions tan evidents com a les 12 setmanes. Respecte a la valoració macroscòpica s'obté 5/12 en el cas d'F17E i 5/12 en F30E. Histològicament, la zona de la lesió S1 (figura 4.36-E-F) està caracteritzada per una matriu d'aspecte hialí, però no es tenyeix amb safranina i conté escassa quantitat de cèl·lules, moltes de les quals s'agrupen en clústers. La superfície està marcadament deprimida en relació amb el cartílag adjacent i els dos territoris S2 adjacents mostren una inclinació orientada cap al centre de la lesió. En aquestes lesions que no van rebre tractament, es va observar teixit ossi esponjós, àrees de teixit conjuntiu, en menor extensió i amb major densitat cel·lular que a les 12 setmanes, obtenint així una puntuació a la valoració histològica de 11/32 per a F17E i 22/32 per a F30E.

A l'anàlisi de les imatges de RMN, en el cas de F17E, s'observa una lesió de morfologia pseudocònica localitzada en l'aspecte caudomedial del còndil femoral intern, que globalment presenta unes característiques de senyal caracteritzades per lleugera hiposenyal T1, lleugera hiposenyal T2 envoltada d'un anell perifèric de baixa senyal en totes les potenciacions corresponent a esclerosi òssia. Aquesta lesió presenta una moderada alta senyal STIR a la superfície de la zona intervinguda i en la seva perifèria s'aprecia una marcada irregularitat i rugositat de la superfície articular que afecta cartílag i os subcondral compatible amb lesió osteocondral en fase inflamatòria corresponent a la lesió realitzada per l'estudi. A l'altra mostra, F30E, existeix una certa esclerosi global del còndil intern en comparació amb el contralateral suggestiu d'incipient osteoartrosi, encara que sense osteofitosi marginal significativa. A la superfície de la zona intervinguda s'aprecia una mínima depressió que afecta al cartílag, compatible amb lesió osteocondral d'aspecte crònic i marcada esclerosi perifèrica que es correspon a la lesió realitzada per l'estudi.

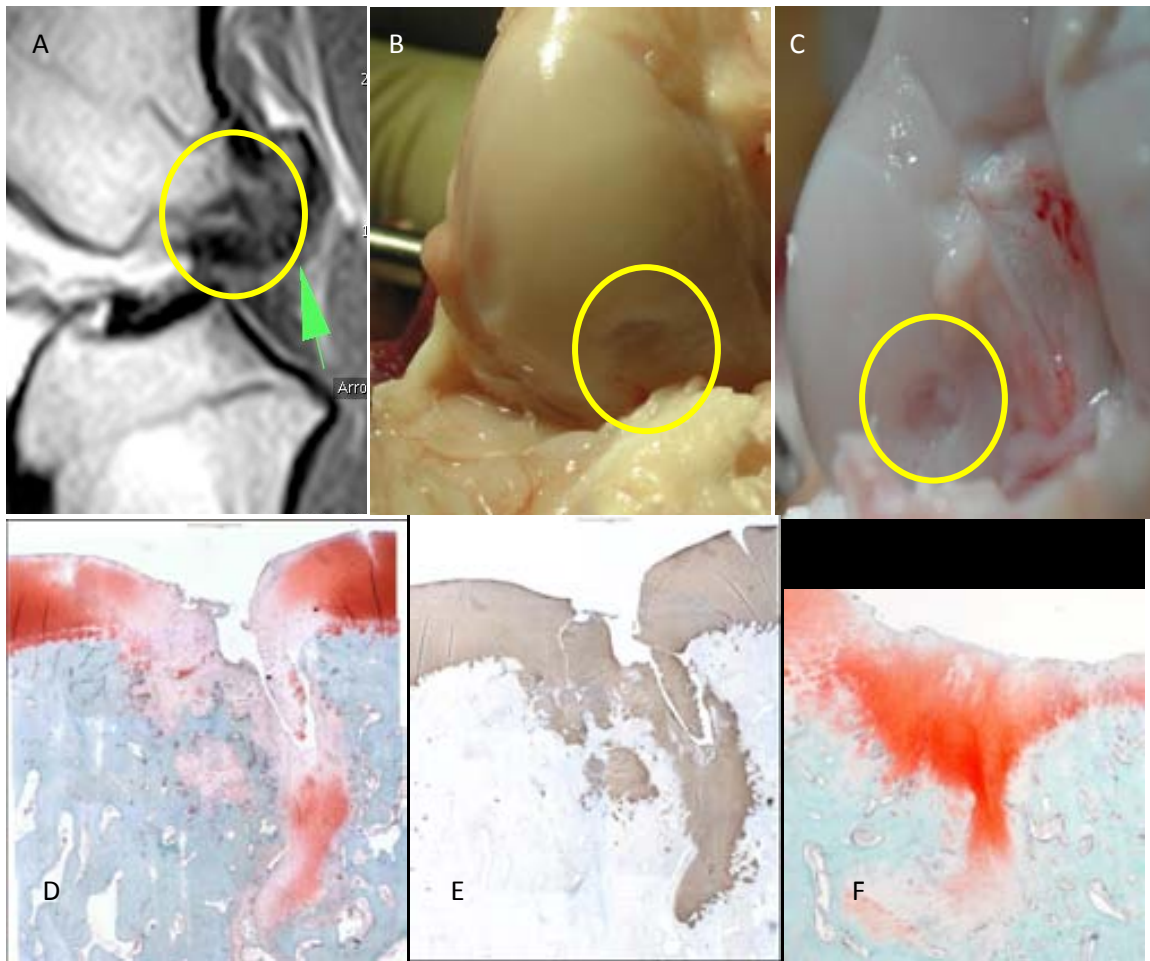


Figura 4.36. Resultats corresponents als còndils medials amb lesió sense tractament a les 20 setmanes (lesió control) post-implantació. A: Imatge de RMN axial de F17E (encerclat en groc el còndil medial); B i C: Imatge macroscòpica F17E i F30E respectivament (encerclat en groc la zona de la lesió); D i E: Imatges d'histologia (F17E) corresponents a Safranina O i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II respectivament; F: Imatges d'histologia (F30E) corresponents a Safranina O.

4.4.2. Conclusions de l'experiment pilot.

A la taula 4.8 es resumeixen els resultats globals de les valoracions histopatològiques i macroscòpiques. Arran dels resultats i les valoracions realitzades, es pot afirmar que en gran mesura, les característiques histològiques depenen de dues variables: el tipus de tractament aplicat a la lesió osteocondral i el temps transcorregut entre la realització de procediment quirúrgic i el sacrifici de l'animal. Els resultats micro i macroscòpics han de ser analitzats en conjunt, ja que un teixit similar al hialí sense ser congruent i continu amb el teixit adjacent sa, no és un teixit que pugui suportar les càrregues de l'articulació i no es comportarà com un cartílag hialí normal.

Taula 4.8. Resum dels resultats de l'avaluació macroscòpica i histològica. Taula A: Ordenada per mostres analitzades temporalment. Taula B: Ordenada per tractaments aplicats. *Mostra no analitzada histològicament. H= Histologia; M=Macroscòpic.

TAULA A

Ovella	Grup	Genoll esquerre (còndil medial)	Histologia	Macroscòpic	Genoll dret (còndil medial)	Histologia	Macroscòpic
F6	12 SETMANES	PLGA	15	9	PLGA + CMMA	23	10
F12		Lesió sense tractament	0*	3	PLGA + CMMA	13	6
F14		PLGA	22	3	Lesió sense tractament	9	4
F16	20 SETMANES	PLGA + CMMA	13	9	PLGA	26	8
F17		Lesió sense tractament	11	5	PLGA + CMMA	27	11
F30		Lesió sense tractament	22	5	PLGA	25	9

TAULA B

Tractament	MOSTRES							
	F12-12 setmanes		F14-12 setmanes		F17-20 setmanes		F30-20 setmanes	
Lesió sense tractament	H	M	H	M	H	M	H	M
		0*	3	9	4	11	5	22
PLGA	F6-12 setmanes		F14-12 setmanes		F16-20 setmanes		F30-20 setmanes	
	H	M	H	M	H	M	H	M
	15	9	22	3	26	8	25	9
PLGA+CMMA	F6-12 setmanes		F12-12 setmanes		F16-20 setmanes		F17-20 setmanes	
	H	M	H	M	H	M	H	M
	23	10	13	6	13	9	27	11

Hi ha, però, un patró histològic en el territori S2 que es repeteix en tots els animals estudiats que consisteix en una marcada disminució de la cel·lularitat, una disminució aparent de la intensitat en la tinció de safranina i la presència de nombrosos clústers o grups de condrocits (figura 4.37), localitzats preferentment a la zona més superficial i que són més abundants a la regió més propera a S1. Es pot interpretar com una migració cel·lular de CMMA que intenten regenerar les zones a regenerar amb clústers de condrocits en direcció cap a S1.

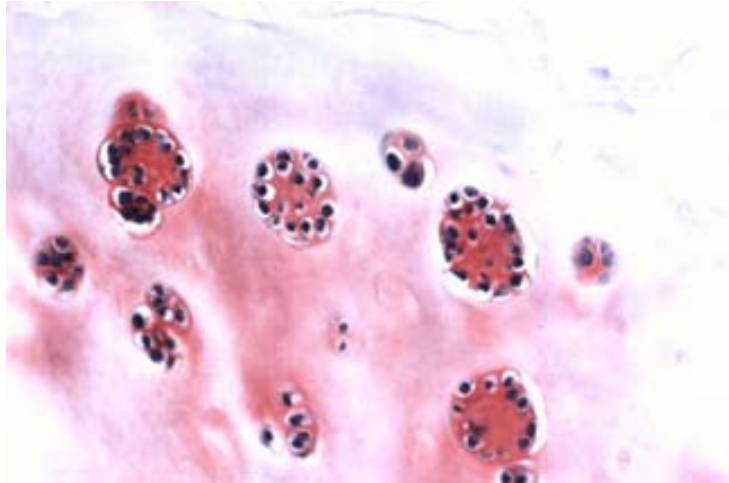


Figura 4.37. Clústers o grups de condrocits que s'observen majoritàriament a les zones S2 i S3 perilesionals.

En els resultats microscòpics, es mostra una clara regeneració en les mostres de matriu amb cèl·lules a les 12 setmanes (F6D), s'observa tinció safranina positiva i col·lagen II positiu, amb una regeneració parcial de l'altura del cartílag, resultant en una puntuació macroscòpica excel·lent. L'osteointegració dels polímers amb l'os subcondral ha estat gairebé completa. En canvi, en les zones perilesional laterals al cartílag hialí (S2), es troba un teixit acel·lular en pràcticament tots els casos tractats amb PLGA sol o amb cèl·lules. L'altra genoll tractat amb PLGA més cèl·lules (F12D) ha generat una resposta extensa, amb acumulació de vasos sanguinis de diferents mides, edema i focus d'aspecte mixoide a la zona d'os subcondral, tot i generar un teixit de morfologia hialina, com indica la valoració histològica.

Per la seva banda, el tractament amb PLGA va mostrar resultats interessants, tant a les 12 com a les 20 setmanes. A les 12 setmanes s'observa com les matrius han estat colonitzades per cèl·lules del propi organisme de procedència dispersa, que podrien arribar des de l'os subcondral cridades per la inflamació generada en l'os o del líquid sinovial i altres teixits adjacents com el greix. Aquestes matrius no colonitzades presenten una osteointegració menor que la matriu F6D. A les 20 setmanes s'observa com en zones de la lesió, aquesta ha estat regenerada per teixit amb senyal safranina O positiu i en altres no dona positiu. El teixit és més tipus fibrós que el hialí observat en les mostres amb PLGA més cèl·lules. Aquest últim tractament a les 20 setmanes ens mostra un teixit completament anivellat (Figura 4.31-B) macroscòpicament i safranina O positiva i col·lagen II positiva. En cap dels casos, els teixits amb tinció safranina O positiva han generat un

cartílag hialí amb totes les característiques normals, i en cap cas s'observa una organització columnar dels condrocits ni tampoc una *tidemark* o línia de marea correcta entre cartílag i os regenerat .

Les lesions sense tractament mostren un marcat enfonsament de la zona lesionada amb un fons irregular d'aspecte fibril·lar, tant a les 12 com 20 setmanes. S'ha observat teixit ossi esponjós, present també en els altres tractaments, àrees de teixit conjuntiu, no present en els altres tractaments, i zones amb senyal safranina O positiu. Els resultats microscòpics i de ressonància mostren una afectació severa de l'os subcondral i altres teixits annexos. Com s'ha descrit anteriorment, es va observar tinció safranina O positiva en la majoria dels casos, però cal remarcar que depenent de la zona on es trobi, significarà una regeneració de cartílag hialí si és a la zona superficial contigua al cartílag sa o bé una regeneració òssia endocondral fisiològica.

En general, de la realització d'aquesta primera prova de concepte en model animal experimental, se'n poden extreure algunes observacions. La primera de les qüestions fa referència a la seguretat dels tractaments aplicats a les lesions osteocondrals generades mitjançant artroscòpia. Totes les ovelles van ser sacrificades sense presentar cap signe de malaltia o patologia derivada per l'aplicació del tractament, ja sigui matriu de PLGA amb cèl·lules o matriu de PLGA sola. Això confirma que la biomatriu utilitzada és biocompatible i segura per a la utilització en animals de grans dimensions com l'ovella durant els períodes de temps analitzats. Els animals van presentar una evolució correcta durant tot l'experiment. Els exàmens clínics generals no han revelat anomalies, amb l'excepció de certa claudicació en el període immediat post-quirúrgic. En el període posterior a la implantació del constructe, els animals no han mostrat cap tipus de reacció adversa, sense augment de la temperatura corporal compatible amb estat febril (absència de pirogenicitat), ni claudicació. Les analítiques i hemogrames realitzats per al control de l'estat de salut dels animals, a les 12 i 20 setmanes, són compatibles amb la normalitat. Els paràmetres bioquímics sanguinis també són compatibles amb la normalitat, destacant només un augment lleuger de la creatinin-quinasa indicadora de dany musculoesquelètic. Aquest fet pot ser degut a l'evolució post-quirúrgica, ja que a l'abordatge artroscòpic es fa malbé el múscul amb les incisions que es realitzen per introduir el material quirúrgic, provocant una inflamació local que provoca l'augment transitori dels nivells de l'enzim creatinin-quinasa.

Els altres aspectes a destacar són la validesa i la viabilitat del procés. La viabilitat queda demostrada per el fet de conservar tots els animal vius i amb els tractaments previstos en el plantejament inicial de l'experiment. La validesa fa referència al grau d'objectivitat de l'experiment i la possibilitat d'extrapolar els resultats del estudi a altres poblacions. L'avaluació dels resultats per part d'especialistes i amb el mètode del doble cec permet augmentar el grau d'objectivitat i afirmar que l'estudi es vàlid. En canvi, l'extrapolació dels resultats a altres poblacions requereix d'una sèrie experimental amb més animals. En el següent capítol es realitza un experiment amb més variables i més animals per cada tractament estudiat, augmentant així el grau de validesa de l'estudi.

La ressonància magnètica és una tècnica d'imatge molt indicada per a l'estudi dels teixits tous com el cartílag ja que aquest conté una gran quantitat d'aigua en la seva composició. Altres tècniques, com els raigs X o l'ecografia, no permeten visualitzar ni diagnosticar amb tanta precisió les variacions d'un cartílag normal. En aquest cas s'ha realitzat un estudi de ressonància magnètica preeutanàsia per avaluar tant la tècnica com els resultats de l'experiment en sí mateix. Els resultats de ressonància magnètica mostren algunes correlacions que semblen indicar un procés de regeneració, com l'edema ossi trobat en la majoria dels genolls tractades amb PLGA amb cèl·lules o només amb PLGA. S'ha vist en altres estudis que el procés de regeneració després d'un trasplantament autòleg de condrocits implica un edema ossi en les primeres fases del període post-operatori (Trattnig et al. 2007). El fet que un dels mecanismes naturals en què la biomatriu es reabsorbeix sigui la hidròlisi, també afavoreix el senyal edematós. No s'ha observat vessament articular en cap dels casos. La tècnica ha permès observar amb gran fiabilitat les restes de matriu als genolls, tant a les 12 com a les 20 setmanes, indicant també la osteointegració d'aquesta en el teixit subcondral. Els resultats de ressonància concorden amb els histològics en aquest sentit. Ha permès observar reaccions estranyes com la possible pèrdua de matriu en alguns dels genolls, reflectint-se en una mida de lesió gran similar a la lesió sense tractar. Finalment, els senyals de les lesions tractades amb PLGA amb CMMA de cartílag hialí són compatibles amb fibrocartílag i esclerosi subcondral en la majoria dels casos.

La tècnica de la RT-PCR s'utilitza en moltes investigacions a nivell bàsic, per identificar l'expressió genètica dels polímers generats, però és limitada molt a l'àmbit *in vitro* (Chen et al. 2004). En canvi, en els experiments *in vivo* amb grans animals no s'acostuma a utilitzar aquesta tècnica, ja que no dona cap informació quantitativa, i com en aquest cas, pot arribar a fer malbé mostres

d'histologia. Tampoc es pot assegurar que les mostres siguin representatives de la regeneració per part de les CMMA i no d'altres tipus cel·lulars, ja que el material del que s'aïlla l'ARN pot provenir de cèl·lules que poden haver migrat d'altres localitzacions anatòmiques del genoll o es pot haver agafat la mostra incorrectament, ja que el camp d'actuació és molt petit i l'error en la recollida de la mostra és possible. Així doncs, aquesta tècnica no es considera recomanable per analitzar les mostres en un assaig preclínic de cartílag més extens.

Els resultats dels tractaments amb la matriu de PLGA, utilitzada en aquest treball, i la seva combinació amb CMMA, ens porten a la conclusió que aquesta és una matriu biocompatible i bioreabsorbible i a les 20 setmanes s'observen restes mínims de matriu. La matriu permet el creixement i la remodelació del cartílag hialí i la substitució d'aquesta per una matriu extracel·lular produïda per la cèl·lules que la colonitzen. Encara que s'hauria d'estudiar millor la fixació de la matriu, a causa de la sospita que un dels casos es va alliberar com a cos lliure dins de l'articulació, generant una lesió similar a les lesions no tractades amb teixit connectiu extens i absència de regeneració hialina. Un dels aspectes més importants és la protecció que ofereix la matriu, davant l'afectació greu que genera la lesió osteocondral sense tractament, protegint l'os subcondral de lesió profunda, amb absència de teixit conjuntiu i osteointegració completa a les 20 setmanes.

Recentment s'han resumit diferents aspectes que s'han d'abordar i que són problemàtics quan s'utilitzen teràpies cel·lular que impliquen biomatrius i CMMA per a la regeneració de defectes condral (Athanasίου et al. 2009). Alguns dels principals punts que es tracten són els següents:

- La mort cel·lular que acompanya el procediment quirúrgic agressiu, que implica una lesió important en els teixits circumdants com el múscul i la membrana sinovial. Això genera una inflamació que actua com a barrera per al correcte ancoratge de la matriu i les CMMA en el nínxol funcional per a intentar regenerar la lesió que existeix.
- Un nombre de cèl·lules viable baix no sintetitzarà la matriu extracel·lular que uneixi els dos teixits que han quedat separats per la lesió.
- Un nombre de interconnexions baix entre la biomatriu i la xarxa de col·lagen no permet la correcta integració.

- Els teixits lesionats tendeixen a la fibrosi, amb una xarxa densa de col·lagen, amb un metabolisme inactiu, obstaculitzant la migració cel·lular de les CMMA.

En aquest estudi s'ha demostrat que la integració és completa a les 20 setmanes entre la matriu de PLGA colonitzada amb CMMA de cartílag hialí i el teixit ossi. No s'ha estudiat en detall el tipus d'interconnexió que s'ha generat, però els resultats d'histologia i RMN fan pensar en una integració funcional correcta. Pel que fa al nombre de cèl·lules viables que generin la matriu extracel·lular, es pot afirmar que a les zones centrals de S1 hi ha suficients cèl·lules viables i la matriu que es genera és compatible amb cartílag hialí. En canvi, a les zones perilesionals, a ambdós costats, existeix un teixit acel·lular, molts cops ocupat per grups de condrocits que sembla que intentin regenerar la zona, com els mostrats a la figura 4.32.

La innovació que incorpora aquest estudi, la implantació del constructe mitjançant artroscòpia, fa desaparèixer quasi per complet els problemes de mort cel·lular derivats d'operacions quirúrgiques, ja que no s'ha observat cap focus de necrosi en les mostres analitzades de PLGA amb CMMA. Per últim, el teixit lesionat que obstaculitza la migració cel·lular, en l'aproximació que s'ha treballat fins ara, és eliminat i substituït completament per la biomatriu amb les CMMA, per tant, és aquest nou teixit el que s'ha d'integrar i no dependre de factors externs com les xarxes denses de col·lagen derivades de processos crònics articulars.

D'aquest estudi es conclou que el tractament amb PLGA i CMMA provinents de cartílag hialí és viable, segur i genera un teixit compatible amb cartílag hialí a les 12 i 20 setmanes, amb una osteointegració del constructe osteocondral completa a les 20 setmanes. Però també s'han observat mancances com el teixit acel·lular que envolta la lesió regenerada i la qualitat del teixit que no arriba a ser completament hialí. Per tant, es proposa en el següent capítol abordar de forma sistemàtica, un assaig preclínic per a la regeneració de lesions osteocondrals, augmentant els temps de tractament, el nombre de mostres, les densitats de colonització i el tipus de CMMA, ja que no està clar quines són les millors candidates per a la regeneració de cartílag hialí.

4.5. Bibliografia.

- Agrawal, C., et al. (2001). "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering." Journal of biomedical materials research **55**(2): 141-150.
- Ahern, B. J., et al. (2009). "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review." Osteoarthritis and Cartilage **17**(6): 705-713.
- Anderson, J. M., et al. (1997). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres." Advanced Drug Delivery Reviews **28**(1): 5-24.
- Antonitsis, P., et al. (2007). "In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine." Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery **6**(5): 593-597.
- Athanasίου, K., et al. (2009). Articular Cartilage Tissue Engineering, Morgan & Claypool Publishers.
- Barry, F.; Boynton, R.E.; Liu, B. i Murphy, J.M. 2001. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Experimental Cell Research. 268:189-200.
- Bastiaansen-Jenniskens, Y. M., et al. (2008). "Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage." Osteoarthritis and Cartilage **16**(3): 359-366.
- Beck, K., et al. (1998). "Supercoiled protein motifs: The collagen triple-helix and the \pm - helical coiled coil." Journal of Structural Biology **122**(1-2): 17-29.
- Bellemans, J. (1999). "Osseointegration in porous coated knee arthroplasty. The influence of component coating type in sheep." Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum **288**: 1.
- Brehm, W., et al. (2006). "Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results." Osteoarthritis and Cartilage **14**(12): 1214-1226.
- Breinan, H. A., et al. (1997). "Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model." The Journal of Bone and Joint Surgery **79**(10): 1439.
- Brittberg, M., et al. (1996). "Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes." Clinical orthopaedics and related research **326**: 270.
- Brown, A. N., et al. (2000). "Combining chondrocytes and smooth muscle cells to engineer hybrid soft tissue constructs." Tissue Engineering **6**(4): 297-305.
- Burger, C., et al. (2007). "The sheep as a knee osteoarthritis model: early cartilage changes after meniscus injury and repair." Laboratory animals **41**(4): 420.
- Burgeson, R. E., et al. (1979). "Collagen heterogeneity in human cartilage: Identification of several new collagen chains." Biochemical and Biophysical Research Communications **87**(4): 1124-1131.
- Caminal, M. (2007). "Estudi d'optimització de la font i el suport per a la regeneració de cartílag hialí. Master-Tesis."
- Chen, G., et al. (2004). "Regeneration of cartilage tissue by combination of canine chondrocyte and a hybrid mesh scaffold." Materials Science and Engineering: C **24**(3): 373-378.
- Chen, G., et al. (2003). "The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness." Journal of Biomedical Materials Research Part A **67**(4): 1170-1180.
- Chen, G., et al. (1999). "Fabrication of PLGA-collagen hybrid sponge." Chemistry Letters: 561-562.
- de la Fuente, R., et al. (2004). "Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells." Experimental cell research **297**(2): 313-328.
- Di Lullo, G. A., et al. (2002). "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen." Journal of Biological Chemistry **277**(6): 4223-4231.
- Eid, K., et al. (2001). "Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA polymer disks in a rat tibial wound." Journal of biomedical materials research **57**(2): 224-231.
- Emin, N., et al. (2008). "Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: Effects of TGF- 1 and microgravity bioreactor culture." Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology **36**(2): 123-137.
- Fan, H., et al. (2006). "Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold." Biomaterials **27**(26): 4573-4580.

- Freed, L. E., et al. (1994). "Composition of cell polymer cartilage implants." Biotechnology and bioengineering **43**(7): 605-614.
- Freed, L. E., et al. (1998). "Culture of organized cell communities." Advanced Drug Delivery Reviews **33**(1-2): 15-30.
- Freed, L. E., et al. (1994). "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering." Nature Biotechnology **12**(7): 689-693.
- Freyman, T. M., et al. (2001). "Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering." Progress in materials science **46**(3-4): 273-282.
- Fujisato, T., et al. (1996). "Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold." Biomaterials **17**(2): 155-162.
- Gee, A. (2009). Cell Therapy: CGMP Facilities and Manufacturing, Springer Verlag.
- Herrmann, J. B., et al. (1970). "Polyglycolic acid sutures. Laboratory and clinical evaluation of a new absorbable suture material." Archives of Surgery **100**(4): 486-490.
- Holy, C. E., et al. (2001). "Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering." Biomaterials **22**(1): 25-31.
- Holland, S. J., et al. (1986). "Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems." Journal of Controlled Release **4**(3): 155-180.
- Huang, F. S., et al. (2004). "Effects of small incongruities in a sheep model of osteochondral autografting." The American Journal of Sports Medicine **32**(8): 1842-1848.
- Jain, R. A. (2000). "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices." Biomaterials **21**(23): 2475-2490.
- Jiang, C. C., et al. (2007). "Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite." Journal of Orthopaedic Research **25**(10): 1277-1290.
- Jones, C. W., et al. (2008). "Matrix induced autologous chondrocyte implantation in sheep: objective assessments including confocal arthroscopy." Journal of Orthopaedic Research **26**(3): 292-303.
- Kang, S. W., et al. (2005). "Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering." Tissue Engineering **11**(3-4): 438-447.
- Karen, B. J. (1999). "The Development of an Embedding Technique for polylactide Sponges." J Biomed Mater Res (Appl Biomater) **48**: 504-510.
- Kost, T. A., et al. (1983). "The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic -actin gene." Nucleic acids research **11**(23): 8287.
- Kretlow, J. D., et al. (2010). "Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects." Tissue Engineering Part A **16**(12): 3555-3568.
- LeBaron, R. G., et al. (2000). "Ex vivo synthesis of articular cartilage." Biomaterials **21**(24): 2575-2587.
- Lee, S. C., et al. (1994). "Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP 2 in PLGA matrix." Journal of biomedical materials research **28**(10): 1149-1156.
- Li, Y., et al. (2001). "Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices." Biotechnology progress **17**(5): 935-944.
- Lin, H. R., et al. (2002). "Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives." Journal of biomedical materials research **63**(3): 271-279.
- Little, C. B., et al. (2010). "The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats." Osteoarthritis and Cartilage **18**: S80-S92.
- Litzke, L. F., et al. (2004). "Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation." Annals of Biomedical Engineering **32**(1): 57-69.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2003). "Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 45.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2001). "Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study." Osteoarthritis and Cartilage **9**: S6-S15.
- Mallein-Gerin, F., et al. (1991). "Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organization in dedifferentiating chondrocytes." European Journal of Cell Biology **56**(2): 364-373.
- Makino, T., et al. (2004). "The effect of graft sizing on osteochondral transplantation." Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery **20**(8): 837-840.

- Marijnissen, W. J. C. M., et al. (2000). "Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM)* 1." Biomaterials **21**(6): 571-580.
- Marler, J. J., et al. (1998). "Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration." Advanced Drug Delivery Reviews **33**(1-2): 165-182.
- Middleton, J., et al. (2000). "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices." Biomaterials **21**(23): 2335-2346.
- Middleton, J. C., et al. (2000). "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices." Biomaterials **21**(23): 2335-2346.
- Miller, E. J., et al. (1974). "Characterization of notochord collagen as a cartilage type collagen." Biochemical and Biophysical Research Communications **60**(1): 424-430.
- Moran, J. M., et al. (2003). "Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering." Tissue Engineering **9**(1): 63-70.
- Nagura, I., et al. (2007). "Repair of osteochondral defects with a new porous synthetic polymer scaffold." The Journal of bone and joint surgery. British volume **89**(2): 258.
- Neri, S., et al. (2011). "Long term in vitro expansion of osteoarthritic human articular chondrocytes do not alter genetic stability: a microsatellite instability analysis." Journal of Cellular Physiology.
- Oakley, S. P., et al. (2005). "Arthroscopy—a potential "gold standard" for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis." Osteoarthritis and Cartilage **13**(5): 368-378.
- Panyam, J., et al. (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." Advanced Drug Delivery Reviews **55**(3): 329-347.
- Park, G. E., et al. (2005). "Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds." Biomaterials **26**(16): 3075-3082.
- Puelacher, W. C., et al. (1994). "Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices." International journal of oral and maxillofacial surgery **23**(1): 49-53.
- Rabotyagova, O. S., et al. (2008). "Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation." Materials Science and Engineering C **28**(8): 1420-1429.
- Roberts, C. R., et al. (1991). "Composition changes in human tracheal cartilage in growth and aging, including changes in proteoglycan structure." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology **261**(2 5-1).
- Rodríguez, E. M., et al. (1997). Cirugía conservadora y mínimamente invasiva, Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo.
- Russlies, M., et al. (2005). "Periosteum stimulates subchondral bone densification in autologous chondrocyte transplantation in a sheep model." Cell and tissue research **319**(1): 133-142.
- Sarro, E. (2010). Sistemes de monitoratge per a cultius de cèl·lules animals adherents. Desenvolupament i aplicacions en models cel·lulars i tissulars., UAB.
- Sato, T., et al. (2001). "Tissue-engineered cartilage by in vivo culturing of chondrocytes in PLGA-collagen hybrid sponge." Materials Science and Engineering: C **17**(1-2): 83-89.
- Temenoff, J. S., et al. (2000). "Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering." Biomaterials **21**(23): 2405-2412.
- Temenoff, J. S., et al. (2000). "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage." Biomaterials **21**(5): 431-440.
- Terada, S., et al. (2000). "Tissue engineering in the twenty-first century." Yonsei Medical Journal **41**(6): 685-691.
- Thomson, R. C., et al. (1996). "Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **7**(1): 23-38.
- Trattig, S., et al. (2007). "MR imaging of osteochondral grafts and autologous chondrocyte implantation." European Radiology **17**(1): 103-118.
- Treilleux, I., et al. (1992). "Localization of the expression of Type I, II, III collagen, and aggrecan core protein genes in developing human articular cartilage." Matrix **12**(3): 221-232.
- Uematsu, K., et al. (2005). "Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold." Biomaterials **26**(20): 4273-4279.

- van den Borne, M. P. J., et al. (2007). "International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture1." Osteoarthritis and Cartilage **15**(12): 1397-1402.
- Van der Kraan, P. M., et al. (2002). "Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering." Osteoarthritis and Cartilage **10**(8): 631-637.
- Vunjak Novakovic, G. (2003). "The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors." Tissue engineering of cartilage and bone: 34-51.
- Vunjak Novakovic, G., et al. (1999). "Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage." Journal of Orthopaedic Research **17**(1): 130-138.
- Vunjak Novakovic, G., et al. (1998). "Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering." Biotechnology progress **14**(2): 193-202.
- Wang, Y. C., et al. (2003). "Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering." Biomaterials **24**(6): 1047-1057.
- Wen, X., et al. (2006). "Fabrication and characterization of permeable degradable poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels." Biomaterials **27**(20): 3800-3809.
- Wendt, D., et al. (2003). "Oscillating perfusion of cell suspensions through three dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity." Biotechnology and bioengineering **84**(2): 205-214.
- Wu, W., et al. (2007). "Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: A preliminary study in nude mice." British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **45**(4): 272-278.
- Yu, D., et al. (2008). "Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology." International journal of oral and maxillofacial surgery **37**(10): 929-934.

CAPÍTOL 5

ASSAIG PRECLÍNIC PER A LA REGENERACIÓ DE DEFECTES OSTEOCONDRAIS

En aquest capítol del treball, es planteja la realització d'un estudi experimental més complet que l'exposat al capítol 4, en animals, seguint la metodologia establerta fins ara, i ampliant el nombre de variables a estudiar. Es presenten els resultats de l'assaig preclínic que s'ha realitzat per avaluar la capacitat de regeneració i reparació de lesions osteocondrals mitjançant una biomatriu de PLGA colonitzada amb CMMA de diferents orígens (moll d'os, cartílag, greix). Les variables que s'afegeixen en aquest experiment són les diferents fonts cel·lulars de CMMA i la dosi cel·lular amb la que es colonitza la matriu de PLGA. L'objectiu final és determinar l'eficàcia i seguretat del tractament objecte d'estudi, que pugui guiar estudis posteriors, i valorar possibles aspectes a considerar en proves clíniques en humans. Durant aquest capítol s'avalua la regeneració del cartílag a nivell histològic, la possibilitat de treballar amb aquesta tecnologia cel·lular artroscòpicament, el seguiment de l'evolució de les lesions mitjançant tècniques d'imatge no invasives i una sèrie de paràmetres que s'exposen més endavant. Es presenten els resultats per separat per les diferents propostes terapèutiques que s'estudien.

5.1. Assaig preclínic per a l'avaluació de CMMA de diferents orígens colonitzades en biomatrius de PLGA per a la regeneració de lesions osteocondrals en model oví.

D'acord amb la metodologia posada a punt en els capítols anteriors, a la taula 5.1 es mostra el cronograma per a realitzar l'assaig preclínic per determinar la capacitat de regeneració de lesions osteocondrals amb el tractament amb PLGA colonitzat amb diferents fonts cel·lulars de CMMA. Es defineix com a temps 0 el moment de la creació de la lesió osteocondral experimental a regenerar i la implantació del producte d'assaig o constructe.

Taula 5.1. Cronograma dels procediments bàsics a realitzar a tots els animals de l'assaig preclínic.

Temps(dies)	Procediments
-60 a -31	Selecció dels animals.
	Ecografia abdominal.
	Estudi radiològic.
-30	Extracció de sang per obtenir plasma per cultiu cel·lular .
-14 a -21	Extracció de teixits: moll d'os, teixit adipós i cartílag articular.
0	Artroscòpia per crear la lesió i per implantar el producte d'assaig (constructe).
210	Hemograma i bioquímica per control sanitari. GRUP 6 MESOS
	Estudi radiològic, estudi amb ressonància magnètica i anàlisi del líquid sinovial de les extremitats. GRUP 6 MESOS
211	Sacrifici de l'animal , necròpsia, avaluació macroscòpica dels genolls i pressa de mostres per a anatomia patològica. GRUP 6 MESOS
280	Hemograma per control sanitari. GRUP 12 MESOS
390	Hemograma i bioquímica per control sanitari. GRUP 12 MESOS
	Estudi radiològic, estudi amb ressonància magnètica i anàlisi del líquid sinovial de les extremitats. GRUP 12 MESOS
391	Sacrifici de l'animal , necròpsia, avaluació macroscòpica dels genolls i pressa de mostres per a anatomia patològica. GRUP 12 MESOS

En aquest assaig preclínic s'introdueixen canvis, respecte a l'experiment pilot discutit anteriorment al capítol 4. En primer lloc, la durada de l'experiment per avaluar la regeneració del cartílag amb la teràpia que es vol provar s'augmenta fins a un màxim de 12 mesos, amb un

sacrifici d'un grup dels animals als 6 mesos, a diferència del pilot on els temps de sacrifici dels animals eren de 12 i 20 setmanes. Alguns dels motius per augmentar la durada de l'experiment han estat el temps de degradació de les matrius *in vivo*, en el cas del PLGA 4-5 mesos, i l'avaluació de la seguretat i l'eficàcia a llarg termini, tant a nivell clínic com histopatològic. Un cop implantada la matriu, s'ha de deixar temps per a que maduri la matriu extracel·lular formada *de novo*. A la taula 5.2 es troben classificats els diferents animals inclosos en l'assaig preclínic, respectant la nomenclatura de l'estabulari ja utilitzada en l'estudi pilot. Aquesta nomenclatura no representa cap problema ja que la discussió dels resultats està ordenada pels diferents tractaments que s'han provat en funció de la font cel·lular.

Taula 5.2. Distribució temporal, a 6 i 12 mesos, de les ovelles a l'assaig preclínic.

6 mesos	12 mesos
F57	F44
F58	F52
F63	F59
F64	F61

El segon dels canvis és l'augment del nombre de lesions experimentals realitzades a cada genoll. En aquest cas, tal i com es recull a la figura 5.1-A, es realitza una lesió osteocondral al còndil medial, com a l'experiment pilot, i també una lesió al còndil lateral, mantenint la tipologia d'aquesta i les mides, 3.5mm x 5-6mm (diàmetre x profunditat) (figura 5.1-B). L'osteointegració òptima de les biomatrius de PLGA que s'ha observat en el capítol 4, fa possible la utilització del còndil adjacent, duplicant així el nombre de proves que es poden realitzar en un mateix animal. Alguns autors apunten que aquest fet pot significar una limitació per a l'avaluació, malgrat no trobar diferències entre les dues localitzacions. En tot cas, s'han assignat els tractaments a l'atzar per disminuir el risc de biaix sistemàtic (Zscharneck et al. 2010). Això ha permès introduir un nou paràmetre a valorar, en aquest cas la densitat de colonització de les matrius, fixant-se un rang de densitats entre $(5E+06 \text{ CMMA/cm}^3)$ de PLGA i $(25E+06 \text{ CMMA/cm}^3)$ de PLGA. Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'economia del procés i la utilització dels mínims animals possibles, són dos dels punts claus en la tria de l'animal model. En aquest cas, reduint el nombre d'animals, reduïm els costos d'estabulació i de l'experiment a la meitat. Aquest canvi també facilitarà la implantació artroscòpica, ja que només s'ha d'obrir un portal d'entrada per l'artroscopi per cada dos matrius que s'implanten.

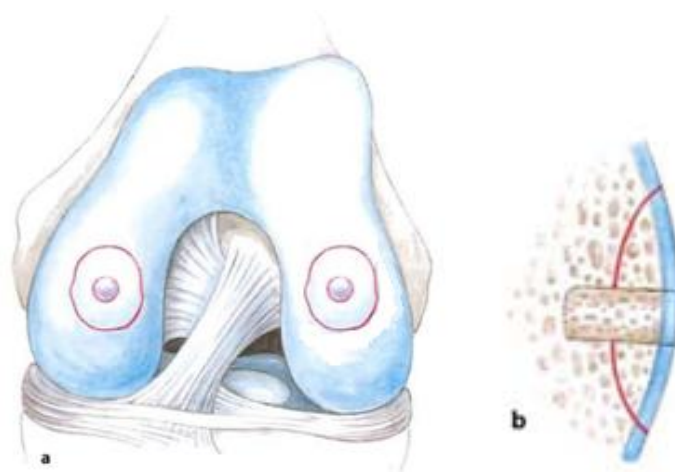


Figura 5.1. Il·lustració de la lesió experimental realitzada mitjançant artroscòpia en els còndils femorals. **a:** Vista superficial; **b:** Vista del còndil en tall sagital, on s'observa la lesió experimental que es genera (Erggelet et al. 2008).

La seguretat és un dels punts claus que s'han d'avaluar en un assaig preclínic. En aquest sentit s'inclouen anàlisis de seguretat sanitària animal com hemogrames i bioquímiques de control. El panell bioquímic que s'analitza en els diferents moments indicats en la taula 5.1, representen els paràmetres de major importància per a l'espècie ovina, alguns dels enzims que s'analitzen es resumeixen a la taula 5.3, obtenint així informació específica de les possibles repercussions de la utilització del candidat a medicament en fase d'investigació, tant a nivell fisiològic (renal, hepàtic i musculoesquelètic) com hematològic (Milne et al. 2006; Russell et al. 2007).

Taula 5.3. Paràmetres i funcions que s'han analitzat durant l'assaig preclínic.

Paràmetres	Funció
Glutamat deshidrogenasa (GLDH)	Funció hepàtica
Glutamilttransferasa (GGT)	Funció hepàtica
Creatinina	Funció renal
Urea	Funció renal
Proteïnes totals	Funció hepàtica, hemorràgia, inflamació i neoplàsia
Albúmina	Funció hepàtica
Creatinquinasa (CK)	Sistema musculoesquelètic
Calci	Sistema musculoesquelètic

El ventall de fonts cel·lulars emprades s'ha ampliat per provar l'eficàcia i la seguretat de les diferents fonts que s'han aïllat i caracteritzat en el capítol 3. A l'experiment pilot del capítol 4 només s'utilitza la font de CMMA provinent de cartílag articular, mentre que ara, s'utilitzen les tres fonts estudiades al capítol 3: CMMA provinents de moll d'os, teixit adipós i cartílag articular.

En aquest assaig preclínic s'ha modificat l'estratègia de complementació dels medis de creixement cel·lular. S'ha utilitzat el sèrum autòleg, en substitució del sèrum boví fetal (FCS) pels requeriments que es necessiten per a una teràpia clínica. Estudis recents han demostrat que els rendiments de creixement i multipotencialitat de les cèl·lules mesenquimals humanes crescudes amb suplementes de sèrum autòleg són igual o millors que els obtinguts amb FCS (Stute et al. 2004), tal i com s'ha demostrat al capítol 3. A més es va detectar en proves prèvies que no totes les CMMA de les diferents ovelles es podien aïllar i expandir amb el sèrum FCS.

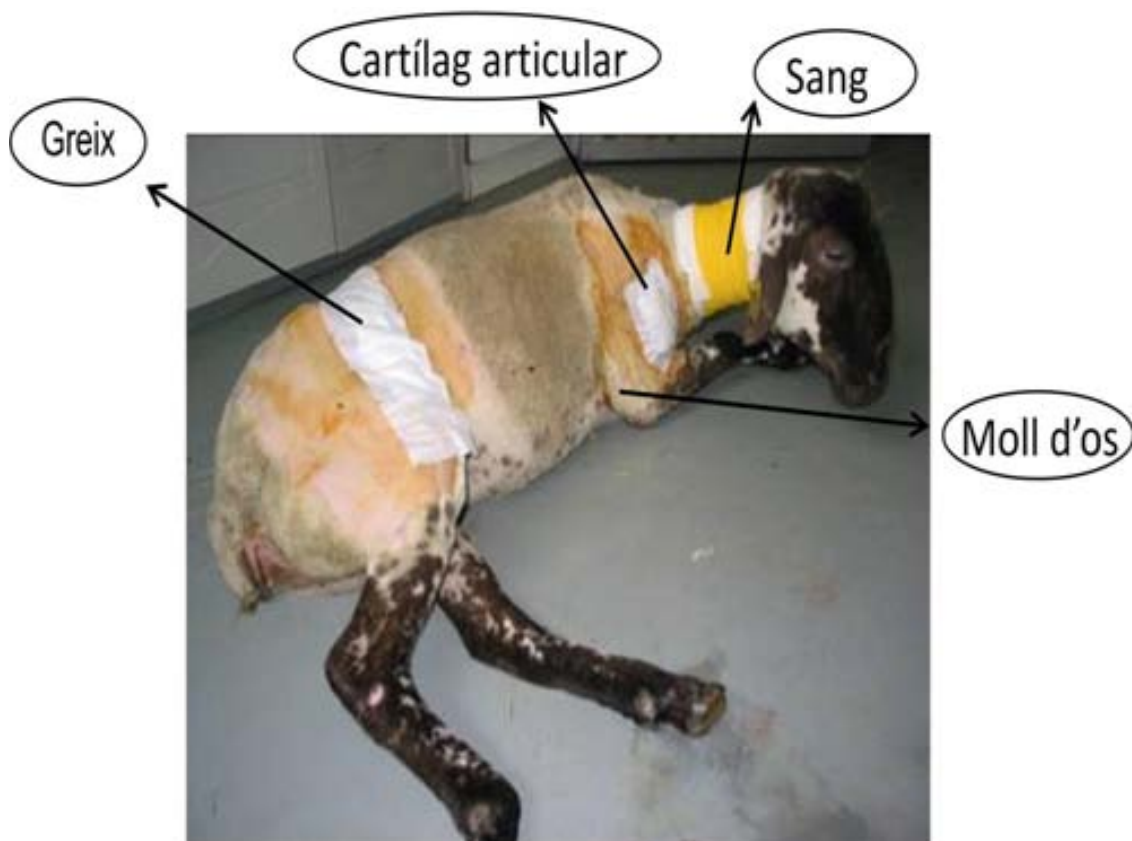


Figura 5.2. Localitzacions dels diferents punts d'extracció en una ovella per a la realització dels experiments preclínic.

A la figura 5.2, les fletxes indiquen les zones anatòmiques d'on s'extreuen els teixits per al processament al laboratori: el greix es va obtenir del flanc dret, el cartílag articular de l'articulació escapulohumeral dreta (espatlla), el moll d'os de l'estern i la sang per preparar el sèrum (per al creixement de les CMMA *in vitro*) de la vena jugular.

Així doncs, amb tots els canvis introduïts, l'assaig preclínic que es planteja queda resumit en la figura 5.3. El temps mínim des del moment en el que s'aïllen els teixits fins que son reintroduïts en forma de CMMA colonitzades en una biomatriu pot ser entre 24 i 26 dies.

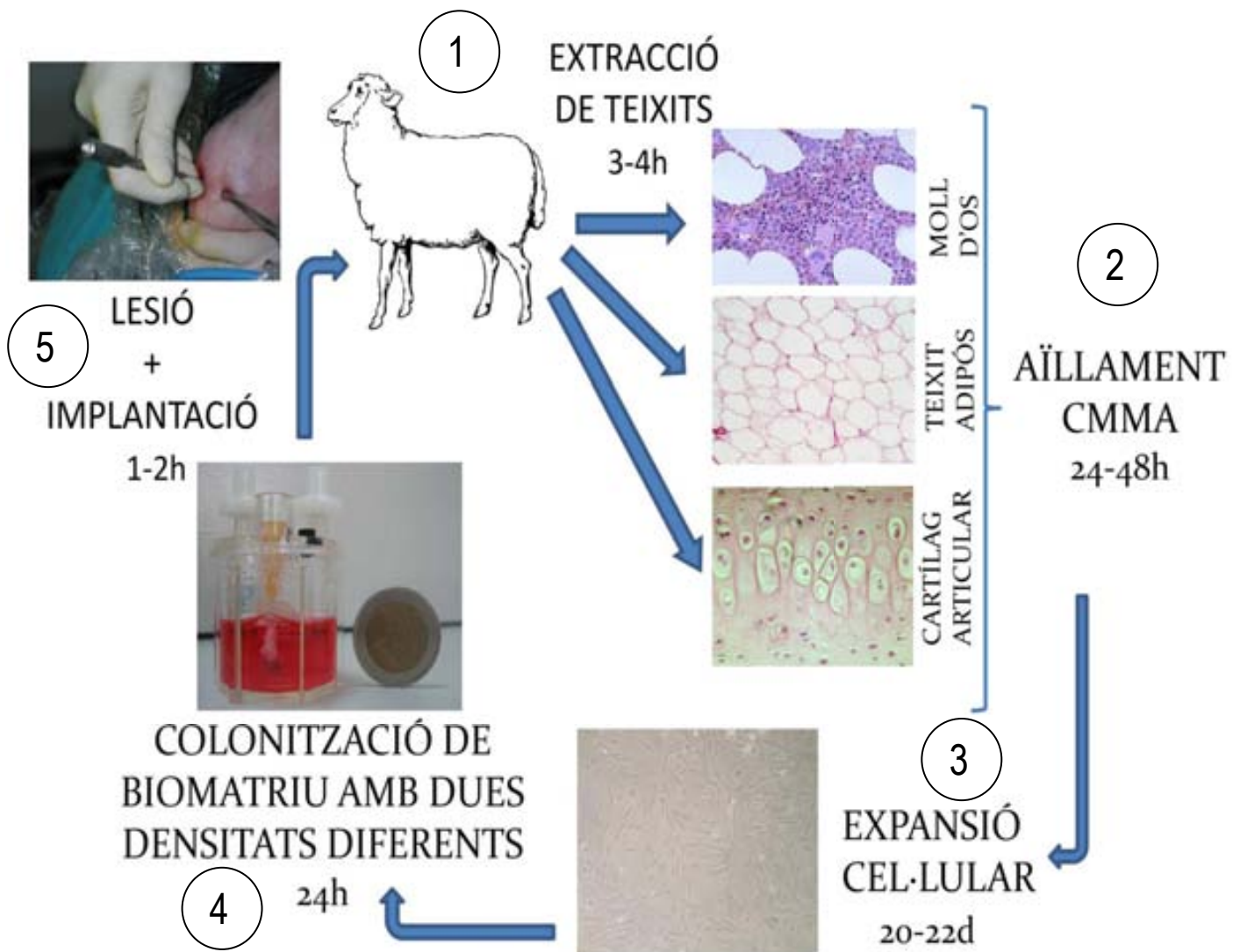


Figura 5.3. Esquema de l'assaig preclínic per a la regeneració de defectes osteocondrals, creats artificialment mitjançant artroscòpia, amb CMMA colonitzades en PLGA, implantades al defecte mitjançant artroscòpia.

5.1.1. Aïllament, expansió i colonització de les CMMA

Un cop definides les condicions de l'experiment que defineix l'assaig preclínic s'inicia amb la selecció dels animals. L'equip de veterinaris realitza un cribat inicial amb hemogrames, bioquímiques i examen clínic per a determinar l'estat de salut dels animals. Els animals amb els que es treballa són 8 ovelles femelles de la raça ripollesa, d'uns 2-3 anys, del Servei de Granges i Camps Experimentals (SGGE) de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. Com a exàmens complementaris es realitza una ecografia abdominal per descartar una possible gestació durant el transcurs de l'experiment, i també es visualitzen les articulacions mitjançant examen radiològic, per obtenir un punt de referència inicial que serveixi per determinar l'evolució de les estructures articulars durant l'experiment i per descartar anomalies articulars.

El tractament autòleg amb sèrum del propi animal, va requerir l'obtenció de sèrum autòleg per al creixement de les cèl·lules. L'obtenció de la sang era molt laboriosa i complicada, i requeria la utilització d'opiacis per a la sedació dels animals. Es varen intentar fer créixer les CMMA amb medi DMEM suplementat amb el sèrum que es mostra a la figura 5.7, però no es van poder fer créixer cap de les tres fonts cel·lulars. S'han observat interferències en el creixement *in vitro* de condrocits humans en pacients medicats amb opiacis (Harrison et al. 2003). En el cas oví, a la figura 5.4 es pot observar l'aspecte blanquinós i l'absència de la separació de la fase sèrica de la hemàtica, fent impossible l'obtenció del sèrum per al creixement de les CMMA.



Figura 5.4. Sang processada per obtenir sèrum d'una ovella tractada prèviament amb opiacis.

La interferència dels opiacis en el creixement que s'ha comentat anteriorment va fer canviar l'estratègia així es va extreure sang, mitjançant agulles de 18G adaptades a bosses col·lectores de sang (Grifols) sense anticoagulant, amb animals no sedats amb opiacis. Les bosses de sang es van traslladar al laboratori pel processament i l'obtenció de sèrum tal i com estableix el protocol de l'apartat 7.3.2. Es varen realitzar proves d'esterilitat amb DMEM suplementat amb sèrum autòleg extret amb bosses i van resultar tots negatius. Llavors es realitzaren proves de creixement amb aquest sèrum, i en aquest cas sí van créixer les CMMA. Es va realitzar un pool sèric de tots els obtinguts per obtenir un suplement homogeni per l'expansió de les línees cel·lulars, ja que, tal i com s'ha demostrat al capítol 3, no totes les línees cel·lular poden ser expandides amb el seu propi sèrum, així doncs, fent un *pool* s'augmenten les possibilitats d'obtenir una expansió correcta. Un cop establerts els lots de sèrum per a cada animal es va procedir a l'extracció de teixits tal i com s'indica a l'apartat 7.1.

Les taules 5.4 i 5.6 resumeixen els aspectes més rellevants relatius al cultiu cel·lular. Les CMMA de cada origen (moll de l'os, cartílag i greix) i de cada animal van ser expandides tal i com s'indica a l'apartat 7.1. L'experiment està planificat per a fer només una ressebra, és a dir, les cèl·lules s'aïllen, s'expandeixen fins a la densitat indicada en la columna Densitat_{fi}, es ressembren a una densitat de sembra 4E+03 CMMA/cm², i s'expandeixen fins que arriba el moment de la colonització. L'expansió cel·lular es va portar a terme en condicions d'esterilitat i fou comprovada diàriament amb l'observació dels flascons de cultiu al microscopi invertit de contrast de fase. No es van observar signes de contaminació bacteriana o de llevats ni fongs en la majoria dels cultius.

Dels 24 cultius primaris, només un va resultar contaminat, tal i com es pot veure a la taula 5.4. Les CMMA provinent del cultiu F63-M no es van poder ressebrar ja que es va detectar una contaminació. La detecció de contaminacions durant els primers dies és de vital importància, ja que si es detecta massa tard, s'ha de tornar a establir el cultiu des del principi, tornant a sotmetre l'animal a una entrada al quiròfan amb sedació i extracció de MO de l'estern, sent aquesta última la principal font de contaminació *per se*. Degut a la quantitat de cèl·lules que es troben al moll de l'os, la dificultat per detectar contaminacions visibles en la observació diària al microscopi abans del rentat de les CMN del moll de l'os, és major en comparació amb els cultius de CMMA provinents de cartílag articular i greix. Tanmateix, es considera que l'estratègia d'aïllament i

expansió és segura i robusta ja que un 95% dels cultius van mantenir l'esterilitat sense presentar cap tipus de contaminació que afectés al creixement cel·lular.

Taula 5.4. Expansió cel·lular de les CMMA utilitzades per a la realització de l'assaig preclínic. Densitat_i: Densitat final a la que van arribar els cultius durant el seu aïllament; La columna de sembra es refereix a la densitat cel·lular a la que es va ressemar el cultiu; Densitat_f: Densitat final a la que van arribar les cèl·lules durant la segona expansió; Les sigles que acompanyen a la identificació de l'animal indiquen la font cel·lular: M: Moll de l'os; C: Cartílag articular; A: Greix (Adipòcits).

Animal	Densitat _i (CMMA/cm ²)	Sembra (CMMA/cm ²)	Densitat _f (CMMA/cm ²)	Duplicacions
F52-C	5.28E+04	4.00E+03	1.85E+04	2.21
F52-A	1.00E+04	3.80E+03	1.14E+04	1.58
F52-M	5.40E+04	2.50E+03	2.25E+04	3.17
F57-C	2.07E+04	4.00E+03	1.35E+04	1.75
F57-A	1.09E+04	2.50E+03	1.40E+04	2.49
F57-M	1.45E+04	4.00E+03	2.60E+04	2.70
F58-C	2.10E+04	4.00E+03	2.44E+04	2.61
F58-A	5.22E+04	4.00E+03	2.00E+04	2.32
F58-M	1.85E+04	4.00E+03	1.40E+04	1.81
F64-C	3.90E+04	4.00E+03	3.65E+04	3.19
F64-A	NO EXPANDIDES PER PROBLEMES DE CREIXEMENT			
F64-M	2.85E+04	4.00E+03	1.35E+04	1.75
F61-C	2.10E+04	2.50E+03	1.55E+04	2.63
F61-A	5.40E+03	1.80E+03	1.30E+04	2.85
F61-M	3.46E+04	4.00E+03	3.45E+04	3.11
F59-C	2.20E+04	4.00E+03	1.95E+04	2.29
F59-A	1.96E+04	4.00E+03	2.35E+04	2.55
F59-M	2.33E+04	4.00E+03	9.50E+03	1.25
F63-C	2.70E+04	4.00E+03	2.40E+04	2.58
F63-A	4.38E+04	4.00E+03	1.95E+04	2.29
F63-M	8.00E+03	4.00E+03	8.00E+03	CONTAMINAT
F44-C	8.04E+04	4.00E+03	6.50E+04	4.02
F44-A	2.04E+04	1.70E+03	2.45E+04	3.85
F44-M	2.36E+04	4.00E+03	2.00E+04	2.32

L'esterilitat és un punt clau per a la seguretat del producte, ja que aquests constructes de cèl·lules i biomatriu que es presenta en aquest treball com a medicament avançat de medicina regenerativa, no permeten una esterilització final prèvia a la implantació en el pacient, ja sigui humana o animal, ja que està format per un material biològic viu i no existeix cap esterilització segura que mantingui la viabilitat cel·lular. En aquest cas, a diferència dels cultius cel·lulars tradicionals, no es poden utilitzar antibiòtics en els medis de cultius, ja que aquests podrien emmascarar una contaminació bacteriana procedent del donant, per tant, els medis de cultiu han d'estar formulats sense antibiòtics. El manteniment de l'esterilitat en els cultius i la certificació de l'esterilitat dels biomaterials que s'utilitzaran per a la teràpia, són aspectes essencials i imprescindibles, per a la seguretat d'aquesta. És per això que es remarca la necessitat, en el cas de realitzar un assaig clínic amb humans, d'implantar més mesures de control de la contaminació com test de *Mycoplasma*, virus, endotoxines, ja que el risc potencial d'infecció per al pacient pot ser superior al benefici que pot aportar la teràpia (Rayment et al. 2010).

De les línees cel·lular expandides, només en un cas no s'han obtingut suficients cèl·lules per a la colonització, la font de CMMA provinent de greix de l'animal F64-A. A la taula 5.5 es pot veure que no hi ha cap cèl·lula fibroblàstica que recordi la morfologia de les CMMA en el cas de F64-A. El cultiu que s'ha realitzat ha estat assumint una densitat màxima de confluència de $6E+04$ CMMA/cm². Per assegurar un mínim de $6E+06$ CMMA de cada font, es van sembrar 600 cm² de cada línia cel·lular a una densitat de $4E+03$ CMMA/cm². No a tots els cultius es van poder obtenir suficients cèl·lules en la primera expansió des de l'aïllament, per tant, tal i com s'observa en la columna de sembra de la taula 5.4, el rang de sembra varia des de $1.7E+03$ CMMA/cm² fins a $4E+03$ CMMA/cm². En 17 dels 24 cultius, més del 70%, es va poder arribar fins a la quantitat de cèl·lules necessària per poder sembrar els 600cm² a $4E+03$ CMMA/cm², demostrant la robustesa del mètode d'aïllament i expansió.

El rendiment d'obtenció de CMMA a la ressebra varia des $5.40E+03$ CMMA/cm² fins $8.04E+04$ CMMA/cm². Si s'analitza cada font cel·lular, en el cas del moll de l'os, el rang es troba entre $8.00E+03$ CMMA/cm² i $5.40E+04$ CMMA/cm², per altra banda, en les CMMA de cartílag articular es troba entre $2.07E+04$ CMMA/cm² i $8.04E+04$ CMMA/cm². Per últim les CMMA de greix presenten un rang situat entre $5.40E+03$ CMMA/cm² i $5.22E+04$ CMMA/cm². Aquests resultats poden estar relacionats amb el rendiment de CMN per mL de MO en el cas de les CMMA

provinents de MO, amb la qualitat del teixit, la quantitat o altres aspectes com la qualitat del sèrum i, en última instància, de les característiques de les cèl·lules autòlogues. S'observa que el rang que presenta el mínim més elevat són les CMMA provinents de cartílag articular, fet que es podria explicar per l'elevat material inicial del que es disposava. En el cas humà, no es podrà tenir aquest avantatge per al cultiu cel·lular, ja que la quantitat de teixit inicial serà menor degut als riscos que presenta l'extracció d'una quantitat excessiva de cartílag articular de qualsevol articulació del cos humà. El cas del teixit adipós és el que presenta el rang més ampli, amb una diferència de 9,6 cops major el valor màxim respecte al mínim, fet que es podria explicar per la qualitat de l'extracció del teixit o per les característiques intrínseques de les CMMA de cada animal. Les CMMA provinents de greix no s'havien aïllat fins al moment en el model oví, així que la tècnica i la recollida del teixit podria ser millorada.

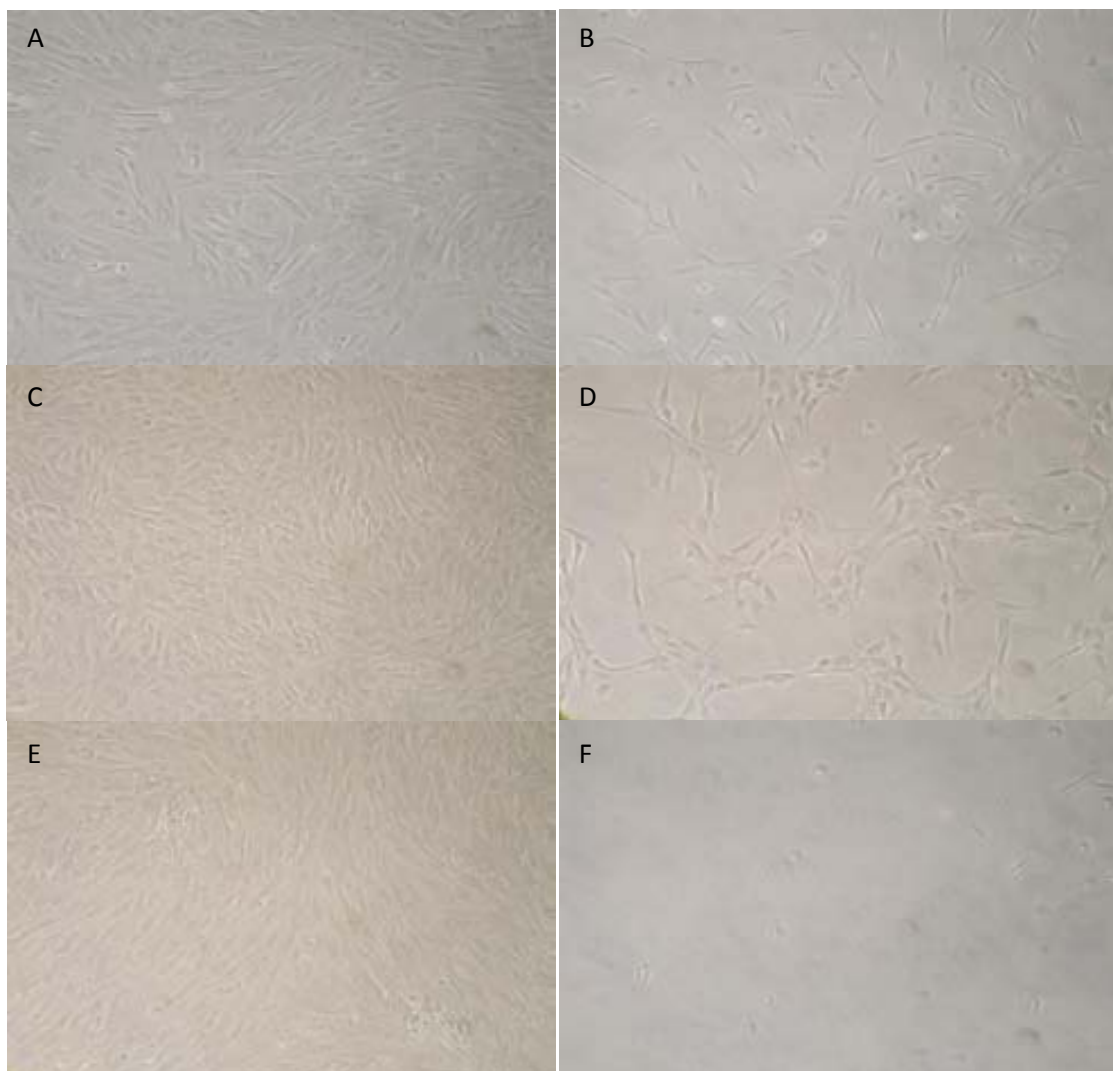


Figura 5.5. Cultius primaris de cada font de CMMA en el moment previ de la tripsinització per a la seva colonització. Moll de l'os: A (F57), B (F58); Cartílag articular: F64 (C), F63 (D); Greix: F61 (E), F64 (F). Fotografies amb un augment de 100X.

Totes les cèl·lules infiltrades van realitzar entre 1.25 i 4 duplicacions durant el cultiu primari més les realitzades prèviament a la primera ressembla. Així doncs, s'assegura una homogeneïtat en els tractaments per a les diferents ovelles, salvant les diferències específiques de cada animal. Aquestes diferències es poden observar en els diferents graus de confluència al que arriben els cultius cel·lulars (figura 5.5), tots ells expandits amb la mateixa estratègia, el mateix medi i el mateix suplement del medi de cultiu.

Es pot afirmar que, d'acord amb una estratègia en cultiu de sèrum *pool*, es va aconseguir escurçar el temps de cultiu, en comparació amb cultius d'experiments anteriors, a causa del seu major rendiment en el creixement, arribant a la dosi necessària en tan sols una ressembla com es demostra en aquest estudi. Alguns dels elements que poden afectar l'expansió de les CMMA són els factors de creixement com el fibroblàstic (FGF), el transformant beta (TGF- β) o el derivat de plaquetes (PDGF), tots ells present en el sèrum en quantitats variables en funció de l'individu del que s'extregui la sang (Ng et al. 2008). A causa de les diferències entre els animals, o pacients en el cas humà, una estratègia de preparació de *pools* pot ser la idònia per evitar problemes de creixement, ja que s'homogeneïtzaria el sèrum i les quantitats de factor de creixement serien iguals per a totes les cèl·lules. Així doncs, un animal que no presenti un nivell alt d'algun factor de creixement en concret, al realitzar el *pool*, veurà compensat aquest dèficit i es podran reduir les diferències en les velocitats de creixement de les diferents CMMA que s'expandeixin. Això podria ser la solució per tal d'establir una teràpia estandarditzada amb un protocol d'expansió cel·lular validat per obtenir la qualitat GMP.

Taula 5.7. Resum de l'aïllament de CMN.

Animal	Volum MO(mL)	CMN(totals)	Rendiment CMN/mL MO
F52-M	48	5.97E+07	1.24E+06
F57-M	50	4.58E+07	9.15E+05
F58-M	45	2.75E+08	6.11E+06
F64-M	48	1.20E+08	2.50E+06
F61-M	48	1.75E+08	3.65E+06
F59-M	16	2.43E+08	1.52E+07
F63-M	45	1.16E+08	2.57E+06
F44-M	46	1.43E+08	3.11E+06

Un dels paràmetres que podria ajudar a estandarditzar els protocols és la relació CMN/mL de MO amb les CMMA obtingudes finalment. Així, sabent el valor de CMN inicials que s'extreuen en un primer moment de l'estern, es podria calcular la superfície necessària per obtenir la dosi, que es necessita per a la teràpia. Si a una teràpia s'estableixen un número determinat de cèl·lules per pacient, aquest mètode podria ajudar a calcular la superfície mínima a sembrar, evitant així que es quedi curta l'expansió i s'hagi de tornar a iniciar el procés d'extracció de MO i cultiu de CMMA posteriors. A la figura 5.5 es mostren en una gràfica els resultats de la taula 5.7 de les mostres de MO dels 8 animals inclosos a l'assaig preclínic. En primer lloc destaca l'elevat rendiment d'obtenció de CMN / MO. S'observa un rang des de 9.15×10^5 / mL MO fins 1.52×10^7 / ml MO, un ordre de magnitud de diferència entre els diferents animals. Això remarca la gran variabilitat interindividual que existeix en quant a l'expansió de CMMA provinents de MO. A la figura 5.5 es mostra en una gràfica la relació CMN/mL de MO amb la concentració màxima de CMMA aconseguida durant l'expansió, on no s'observa cap tipus de relació. Tampoc s'ha aconseguit correlacionar, en aquest experiment, cap paràmetre bioquímic ni hematològic amb el rendiment d'obtenció de CMMA, de manera que, no és possible determinar quins animals podrien ser els adequats per a obtenir la dosi establerta en l'assaig ni calcular la superfície necessària a sembrar per a cada animal. No es pot predir a priori la qualitat de la mostra de MO amb cap prova ni anàlisi prèvia a l'extracció i expansió de les CMMA ovines.

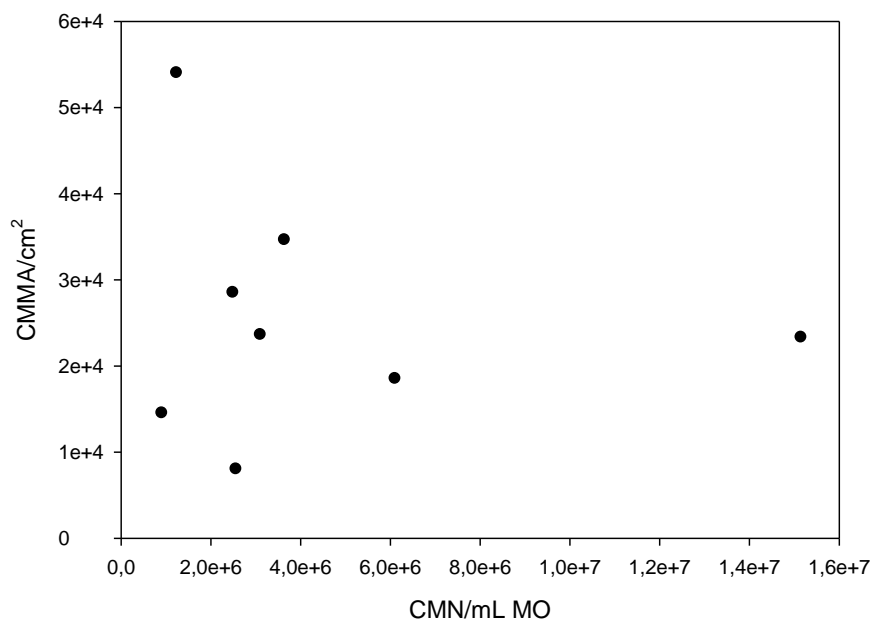


Figura 5.5. Relació del rendiment d'aïllament de CMN de moll d'os (CMMA/cm²) amb la densitat cel·lular abans de la primera ressebra.

En el cas humà no existeixen estudis com aquest, així que podria existir alguna correlació entre la quantitat o la qualitat del MO extret amb les CMMA que s'aconsegueixin. Per tant, podria afectar el procés productiu de futurs assaigs clínics, per la qual cosa s'haurà de tenir en compte en el moment de planificar quant material de partida permet obtenir la dosi terapèutica. En el cas del cartílag i el teixit adipós, no es va realitzar cap anàlisi inicial del rendiment cel·lular per la dificultat d'aquest. En el cas del cartílag, no es pot distingir les cèl·lules al microscopi en la seva disgregació inicial i, en el cas del teixit adipós, no es va aconseguir disgregar tot el teixit extret, de manera que el rendiment calculat seria erroni en relació al material de partida. Aquest fet denota la dificultat que pot suposar un cultiu cel·lular d'aquestes característiques.

Un cop expandides totes les línees cel·lulars i amb la informació de les densitats finals, es van portar a terme les colonitzacions d'acord amb el protocol establert a l'apartat 7.7.1, sense trobar presència d'agregats cel·lulars ni contaminació durant les 24 hores preimplantació. Es va realitzar una ressebra posterior conjuntament amb la colonització per determinar si durant el procés de colonització s'havia generat alguna contaminació. En cap cas es van observar signes visibles de contaminació bacteriana o fúngica.

Taula 5.8. Tractaments aplicat als diferents animals de l'assaig preclínic. Resum de las quantitats de CMMA colonitzades a les matrius de PLGA. Matrius de PLGA de 4 mm de diàmetre i 8-10 mm d'alçada.

Ovella		Genoll esquerre		Genoll dret	
		Còndil medial/ CMMA colonitzades	Còndil lateral/ CMMA colonitzades	Còndil medial/ CMMA colonitzades	Còndil lateral/ CMMA colonitzades
F57	6 MESOS	CMMA Adipòcits 4.50 E+06	CMMA Condròcits 3.96 E+06	CMMA Moll d'os 3.18 E+06	CMMA Moll d'os 4.86 E+06
F63		CMMA Condròcits 1.34 E+06	CMMA Moll d'os 1.35 E+06	CMMA Adipòcits 0.98 E+06	CMMA Condròcits 0.93 E+06
F58		CMMA Moll d'os 1.35 E+06	Lesió sense tractament	CMMA Adipòcits 3.54 E+06	CMMA Condròcits 3.90 E+06
F64		CMMA Condròcits 2.40 E+06	CMMA Moll d'os 4.98 E+06	PLGA	PLGA
F52	12 MESOS	CMMA Adipòcits 1.01 E+06	Lesió sense tractament	CMMA Condròcits 4.20 E+06	CMMA Moll d'os 3.24 E+06
F61		CMMA Moll d'os 4.92 E+06	CMMA Condròcits 0.74 E+06	CMMA Condròcits 1.14 E+06	CMMA Adipòcits 1.07 E+06
F59		CMMA Moll d'os 1.40 E+06	Lesió sense tractament	CMMA Adipòcits 2.58 E+06	CMMA Condròcits 3.72 E+06
F44		CMMA Condròcits 1.14 E+06	CMMA Moll d'os 4.92 E+06	PLGA	PLGA

Es classifiquen les mostres en funció de les colonitzacions i la densitat cel·lular que presenten les matrius. Aquells còndils amb més de 1.5×10^6 CMMA són considerats d'alta densitat de colonització, i aquells per sota d'aquesta xifra són de baixa densitat. A la taula 5.8 es mostra la distribució dels tractaments per animals i la quantitat de CMMA colonitzades en cada constructe implantat. Els cultius de baixa densitat mostren un rang de colonització entre 1.01×10^6 CMMA i 1.35×10^6 CMMA. En canvi els cultius d'alta densitat mostren un rang més ampli, entre 2.40×10^6 CMMA i 4.92×10^6 CMMA. Tot i tenir això en compte, els cultius d'alta densitat, dupliquen o tripliquen la densitat baixa, així es poden establir diferències amb un llindar establert en 1.50×10^6 CMMA per diferenciar els cultius d'alta i baixa densitat.

5.1.2. Anàlisi de resultats macroscòpics, histològics i de diagnòstic per imatge.

Els estudis preclínics per a les noves teràpies de reparació i regeneració del cartílag han aplicat amb èxit sistemes de gradació histològics estructurals per avaluar els efectes del tractament (Murphy et al. 2003). Aquestes avaluacions han de ser realitzades per professionals capacitats i en mode d'estudi cec, és a dir, sense coneixement en el moment de l'avaluació dels tractaments aplicats a cada animal.

Els criteris de valoració més importants són els valors macroscòpics i histològics, però poden ser complementats i validats amb tècniques de diagnòstic per imatge no invasives, com per exemple la ressonància magnètica, que permeten realitzar un seguiment de l'evolució durant el temps que duri el tractament i predir els resultats funcionals. El teixit en reparació i regeneració, sovint, és heterogeni, pel que és de gran importància per a la recerca la utilització de mètodes que redueixin al mínim el biaix, en la mesura del possible, mitjançant un anàlisi planificat anteriorment dels mètodes de mostreig imparcial.

L'estandardització de la recollida de mostres histològiques, el tractament de les dades i l'avaluació quantitativa és clau per desenvolupar millors mètodes d'anàlisi que, en un futur, possiblement proporcionen eines de pronòstic per avaluar els resultats de la reparació del cartílag mitjançant algorismes encaminats al tractament de les lesions osteocondrals. Malgrat tot els

avenços, a l'actualitat no hi ha substitut adequat per a les avaluacions histològiques que confirmin la qualitat del teixit i el caràcter cartilaginós de la regeneració (Hoemann et al. 2011).

En aquest treball, a nivell macroscòpic s'avaluen els possibles efectes sobre l'organisme amb una necròpsia portada a terme per especialistes anatomopatòlegs de la facultat de veterinària de la UAB. La valoració de la regeneració del cartílag, a nivell macroscòpic també, s'ha efectuat per part de traumatòlegs especialistes en lesions osteocondrals, mitjançant una artrotomia de les articulacions i s'ha realitzat l'estudi seguint els criteris *Oswestry*, tal i com recomana la *Internacional Cartilage Repair Society* (ICRS) (Mithoefer et al. 2011). Per avaluar el grau de reparació del cartílag articular a nivell histològic, els anatomopatòlegs veterinaris han utilitzat el sistema de gradació recomanat per la ICRS (Mainil-Varlet et al. 2003). A l'apartat de materials i mètodes 7.8.1 es descriu tant el sistema de gradació macroscòpic com histològic, amb les taules d'avaluació corresponents (taula 7.10 i 7.12). En l'exposició dels resultats, els valors que es resumeixen a les taules corresponen als resultats que es troben a l'annex del capítol 8. Els comentaris sobre les imatges de RMN han estat realitzats per un dels experts en interpretació de ressonància magnètica veterinària del hospital clínic veterinari de la UAB.

La necròpsia realitzada pels anatomopatòlegs apunta l'aparició a nivell macroscòpic, en tres dels animals (F44, F52, F59), d'una limfadenopatia lleu mesentèrica, poplítica i inguinal superficial. Aquesta troballa pot ser interpretada dintre de la normalitat en el curs clínic de l'animal. No es van observar altres lesions macroscòpiques en els òrgans interns dels animals. Una vegada obertes les articulacions femorotibials per a la seva avaluació, no es van observar alteracions significatives en la càpsula, sinòvia i d'altres estructures associades a l'articulació (tendons i lligaments).

A nivell microscòpic tots els animals presentaven els limfonodes poplitis profunds amb una quantitat variable de macròfags en forma aïllada o formant acumulacions al paracòrtex i al còrtex interfol·licular, o també macròfags vacuolitzats en els centres germinals dels fol·licles. En canvi, no es van observar àrees o focus de cèl·lules forànies al limfonode La resta d'òrgans en totes les ovelles presentaven característiques normals. En cap de les ovelles es van observar lesions en els òrgans que puguin derivar aparentment del tractament administrat en els còndils femorals, indicant que la teràpia no presenta cap tipus de toxicitat en el tractament de llarga durada.

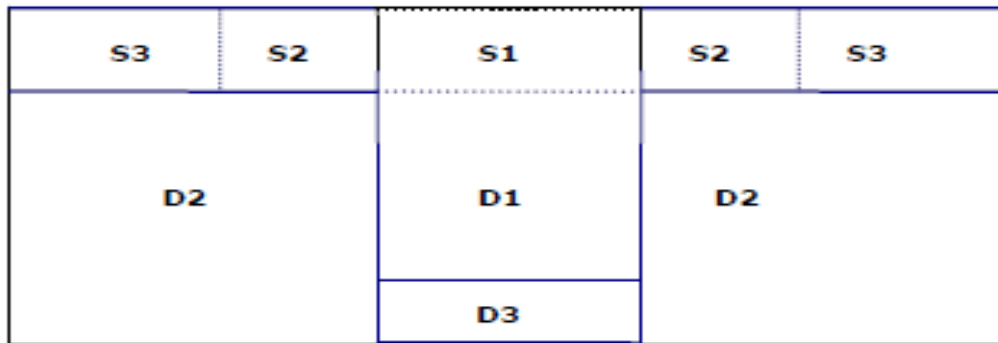


Figura 5.6. Esquema de les zones divisòries virtuals en les que s'ha dividit el cartílag per a realitzar la descripció histològica. S: Zona superficial; D: Zona profunda. La numeració correspon a la zona de la lesió (1), adjacents (2) o profundes (3).

Els resultats es presenten ordenats en base als tractaments aplicats a cada defecte osteocondral. En cada cas s'analitza l'aspecte macroscòpic, la histologia i la imatge que presenta en la RMN, i es presenten per a cada animal i per a cadascuna de les articulacions femorotibial, descrivint el cartílag articular del còndil medial i lateral per separat ja que el tractament administrat va ser diferent. Pel que fa a la descripció histològica per zones, s'utilitza la mateixa metodologia que s'ha utilitzat al capítol 4 en l'experiment pilot (figura 5.6.). Degut a la gran quantitat d'informació, en la descripció dels resultats només es mostren les imatges més representatives obtingudes durant l'anàlisi de les mostres de teixit i de les imatges tant macroscòpiques com de ressonància magnètica nuclear. A l'annex I del capítol 8 es troben recollides les puntuacions específiques de cada valoració amb les que s'ha fet l'avaluació histològica i macroscòpica d'aquest assaig preclínic.

5.1.2.1. Grup de lesió osteocondral control sense tractament.

En aquest grup experimental s'han analitzat tres còndils, un d'ells corresponent a 6 mesos i dos a 12 mesos. Tal i com s'ha comentat anteriorment, el grup control en un experiment de regeneració de teixit és clau per mostrar les diferències existents entre l'aplicació de qualsevol tractament i la lesió sense tractar. Així doncs, en aquest assaig preclínic s'utilitzen les mateixes característiques de la lesió del experiment pilot, però a uns temps diferents, en aquest cas els animals seran avaluats a 6 i 12 mesos.

La figura 5.7 recull els resultats més representatius de les mostres amb lesió control sense tractament. Aquests mostren una zona de la lesió S1 que està deprimida i la seva superfície és irregular. El marge dret presenta una fissura que arriba fins a l'os subcondral, provocant que la integració no sigui totalment completa. A les zones superficials i mitjanes els condrocits són aplanats, mentre que en la porció profunda els condrocits es disposen en columnes. S'observa una àmplia zona de la superfície articular que s'ha reparat en forma de fibrocartílag i presenta alguns focus de vascularització (figura 5.7-E). Els proteoglicans es limiten a l'espai territorial dels condrocits columnars i no es troben a la superfície (figura 5.7-F), fins a un contingut similar al que presenta el cartílag normal adjacent. El col·lagen II (figura 5.7-G) es concentra en major quantitat en la zona mitja de la superfície articular i més feble en la porció profunda. El fet de tenir totes les lesions sense tractament situades en un CLE és degut a l'atzar, disminuint així el biaix sistemàtic en el disseny de l'experiment.

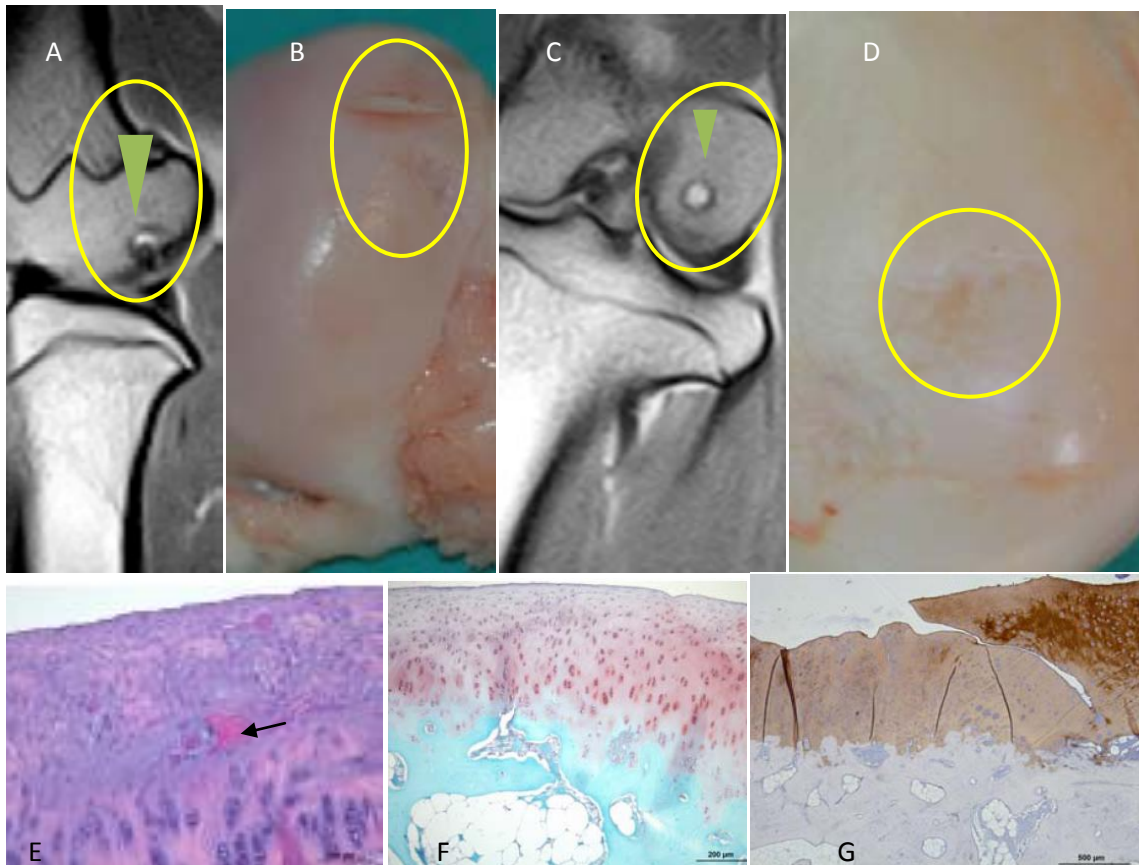


Figura 5.7. Resultats corresponents als còndils amb lesió sense tractament als 6 (F58) i 12 (F59 i F52) mesos (lesió control) post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F58 CLE; C-F59 CLE) i imatge macroscòpica (B-F58 CLE; D-F59 CLE) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Hematoxilina-Eosina (F52 CLE), Safranina O (F52 CLE) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (F59 CLE) respectivament. Amb una fletxa negra és marca la zona vascularitzada en la imatge E. Barra d'escala: E: 100µm; F: 200µm; G: 500µm.

A l'avaluació macroscòpica s'observen resultats dispars, amb una lesió (figura 5.7-B) que mostra un bon recobriment en la superfície de cartílag regenerat, amb aspecte deprimat, no anivellat amb el cartílag adjacent, però normocolorat, i una lesió (figura 5.7-D) que no es troba anivellada, presenta fissures i molta incongruència que pot donar inestabilitat articular.

L'anàlisi de les imatges de RMN (figura 5.7-A) mostra discrets signes d'edema ossi associat i les seves dimensions coincideixen amb la mida aproximada de la matriu implantada. En un altre animal (figura 5.7-C) s'observa una lesió de morfologia esfèrica localitzada en l'aspecte caudomedial del còndil femoral lateral, que globalment presenta senyal hiperintensa central i hipointensa perifèrica en totes les potenciacions. No s'observa edema ossi perilesional. Aquestes lesions tipus quístiques que s'observa a la RMN són típiques de les lesions osteocondrals, que dintre dels seu procés de reparació tissular acostumen a formar aquesta mena de quist subcondral (Jackson et al. 2001).

Els resultats de les diferents valoracions efectuades es troben resumides a la taula 5.9, on es pot observar que la mitjana de la valoració histològica per a les lesions control a 12 mesos és de $10.5 \pm 3.5/18$ i l'únic cas a 6 mesos puntua 12/18. Així histològicament es consideraria les lesions de grau I, és a dir, quasi normals. En el primer cas (F52CLE) destaca la puntuació de la valoració macroscòpica, que sembla totalment regenerat, en canvi la histologia denota una depressió del cartílag, en línia amb els resultats obtinguts a l'experiment pilot amb les lesions control. Encara que presentin una bona aparença histològica, el gruix del cartílag no és l'adequat i això pot generar una incongruència que amb el temps pot acabar tornar a degenerar el cartílag i evolucionar cap a malalties com l'osteoartritis (OA).

A les diferents peces s'observa l'os esponjós engrossit, envaint el cartílag hialí i reduint el seu gruix. Aquest fet hi és present en altres treballs, Erggelet i col·laboradors van estudiar la regeneració de lesions osteocondrals combinant la tècnica de microfractura amb la utilització de biomatrius com a suport estructural per a la regeneració del cartílag (Erggelet et al. 2007) i els grups control evidencien una disminució en el gruix del cartílag, una depressió a la superfície i la manca de formació de cartílag hialí. En les peces que s'han analitzat, la valoració global és que s'ha format majoritàriament un cartílag hialí en gran part de la lesió generada, però amb un gruix

inferior al cartílag adjacent, o per altra banda s'ha reparat amb teixit fibrocartilaginós (F52CLE). A nivell macroscòpic, als 6 mesos només es disposa d'una peça que es valora en 5.33, en canvi als 6 mesos la valoració augmenta un 31% fins a 7 sobre 10. Aquest augment és degut a la valoració amb puntuació màxima de F52CLE, on s'ha de suposar que s'ha donat una regeneració espontània. Si es realitza una anàlisi percentual de les diferents valoracions, en els resultats macroscòpics als 6 mesos, s'obté un 53% de la puntuació màxima, i en el cas dels anàlisis histològics, el tant per cent és similar (66.7%), en canvi als 12 mesos la valoració macroscòpica arriba fins al 70% i al 58.5% en la histològica.

Taula 5.9. Resultats corresponents a còndils amb lesió control sense tractament. Avaluació de la membrana sinovial, de l'aspecte macroscòpic i de les característiques microscòpiques.

	Macroscòpica	Histològica	Safranina 0	Col·lagen tipus II	Membrana sinovial
Mostres avaluades als 6 mesos					
F58 CLE	5.33±0.40/10	12/18	2/4	2/4	0/4
Mostres avaluades als 12 mesos					
F52 CLE	10/10	13/18	1/4	4/4	0/4
F59 CLE	4/10	8/18	4/4	2/4	0/4

Els resultats globals d'aquest subgrup d'estudi difereixen significativament amb els resultats que s'ha observat a l'experiment pilot del capítol 4 i la bibliografia consultada amb experiments similars en ovelles (Guo et al. 2004). Malgrat no rebre cap tractament, el fet de generar una lesió osteocondral ja s'assembla al tractament de microfractura, ja que les lesions van sagnar i el teixit que s'ha generat pot haver esdevingut una conseqüència de l'exposició del moll de l'os on es troben progenitors mesenquimals que tenen la capacitat per regenerar el cartílag hialí. Existeix una relació entre l'edat de l'animal i la capacitat de regeneració espontània del cartílag, on quan més jove més capacitat de regeneració presenta l'animal (Wei et al. 1997), però es descarta la hipòtesi de l'edat que podria explicar la reparació espontània que s'ha donat en aquest grup, ja que les ovelles eren totes femelles de més de 3 anys en el moment de començar l'experiment i les radiografies mostren els cartílags de creixement tancats. Cal remarcar també el nombre de peces estudiades, només una a 6 mesos i dues a 12 mesos, comparat amb les 4 o 5 peces per grup temporal i subgrup temporal que s'exposen a continuació.

5.1.2.2. Grup de lesió osteocondral tractat amb biomatriu PLGA sense CMMA.

En altres espècies animals, conill (Solchaga et al. 2005), porc (Jiang et al. 2007) i ovella (Erggelet et al. 2007), s'han provat matrius lliures de cèl·lules per tractar de regenerar lesions osteocondrals, però els resultats no són tan esperançadors com les tècniques que combinen la utilització de CMMA vehiculitzades per les biomatrius. En el cas del polímer que s'estudia en aquest cas, el PLGA, s'ha demostrat en el capítol anterior que pot induir una certa diferenciació del teixit cap a cartílag hialí, així doncs, en aquest cas, en el assaig preclínic s'estudia també l'efecte de l'implantació de PLGA en lesions osteocondrals creades artificialment per analitzar la possible regeneració del cartílag hialí.

Com s'ha comentat anteriorment, només es disposa de dues peces per l'estudi del PLGA sense CMMA per a la regeneració de defectes osteocondrals, i ambdós a temps 12 mesos, ja que l'ovella F64 va morir per una pneumònia durant l'experiment, no podent-se analitzar les peces de PLGA en animals sacrificats a 6 mesos. Així doncs l'únic animal del que es disposen dades és el número F44. Els resultats (figura 5.8) mostren una lesió en la zona S1 alineada amb el cartílag articular normal adjacent, encara que amb lleugeres irregularitats, format per cartílag hialí i condrocits individuals desorganitzats, i en àrees més profundes per una matriu més fibrosa. La integració del cartílag articular en els territoris S1 i S2, l'os subcondral es mostra irregular. En D1 l'os subcondral presenta restes de cartílag calcificat, i alguns dels espais de l'os esponjós ocupats per teixit conjuntiu lax. El contingut en proteoglicans i col·lagen II és similar al cartílag sa en un cas (figura 5.8-E) però escàs en l'altra mostra (figura 5.8-F).

A la valoració macroscòpica s'obté una puntuació entre 2/10 i 6/10, ja que la lesió no es troba anivellada (figura 5.8-A), amb depressions profundes o amb fissures dintre de la zona regenerada (figura 5.8-D).

Les imatges de RMN (figura 5.8 A i C) mostren una lesió d'una mida major que la lesió i amb una irregularitat més marcada de l'os subcondral encara que no es visualitzen fragments despresos del cartílag.

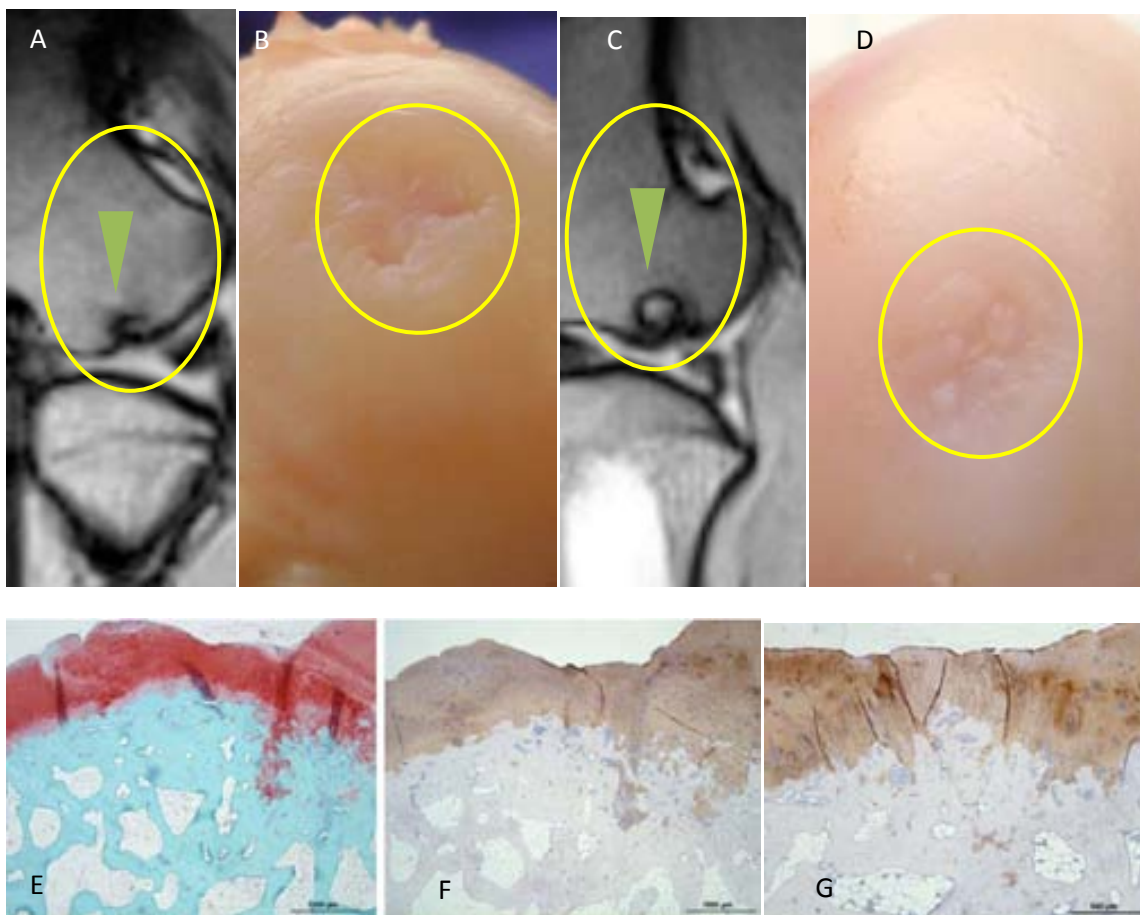


Figura 5.8. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA sense CMMA, als 12 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F44 CMD; C-F44 CLD) i imatge macroscòpica (B-F44 CMD; D-F44 CLD) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Safranina O (E-F44 CMD) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (F-F44 CMD; G-F44 CLD) respectivament. Barra d'escala: E: 1000µm; F:1000µm; G: 500µm.

Al no disposar de resultats a 6 mesos sobre la utilització de PLGA per la regeneració de defectes osteocondrals, no es pot fer un anàlisi temporal d'aquest. Partint de la base dels resultats obtinguts a l'experiment pilot del capítol 4 on als 5 mesos s'observava una matriu reabsorbida i osteointegrada, es confirmen aquestes dades a 12 mesos, on no es troben traces del PLGA i l'osteointegració d'aquest es correcta. S'observa en els dos casos regeneració de l'os subcondral. Així doncs, el producte que s'està utilitzant es segur i no genera cap tipus de rebuig ni reacció adversa en l'organisme a llarg termini (12 mesos). Encara que les puntuacions globals de la valoració histològica (taula 5.10) són inferiors al grup control, 7.5 ± 0.7 front a 10.5 ± 3.5 , a la valoració punt per punt, el tractament amb PLGA genera una matriu hialina en els dos casos, un os subcondral regenerat i una viabilitat cel·lular excel·lent, a diferència dels resultats control, on dos d'ells no generen matriu hialina però si tenen una superfície regular, llisa i contínua, fet que compensa la puntuació global i fins i tot la fa superior al del grup tractat amb PLGA. S'ha de tenir

en compte la valoració global com idea de regeneració del conjunt del teixit, però aquets matisos són importants per la valoració d'un tractament que intenta regenerar cartílag hialí. A nivell macroscòpic les dues peces presenten fissures parcial a la superfície i no es troben anivellats amb el cartílag adjacent, amb una mitjana de valoració de 4 ± 2.8 sobre 10 que és la puntuació màxima. Si es realitza una anàlisi percentual de les diferents valoracions, en els resultats macroscòpics s'obté un 40% de la puntuació màxima, i en el cas dels histològics el tant per cent és similar (41.7%).

Taula 5.10. Resultats corresponents als còndils tractats amb biomatriu PLGA sense CMMA als 12 mesos. Avaluació de la membrana sinovial, de l'aspecte macroscòpic i de les característiques microscòpiques.

	Macroscòpica	Histològica	Safranina 0	Col·lagen tipus II	Membrana sinovial
Mostres avaluades als 12 mesos					
F44 CLD	6/10	8/18	1/4	4/4	0/4
F44 CMD	2/10	7/18	4/4	4/4	0/4

A l'igual que a l'experiment pilot, els còndils tractats amb PLGA sense CMMA presenten cèl·lules que durant el procés de regeneració s'han diferenciat cap a diferents llinatges, ja que a les biòpsies s'observen condrocits, grups de condrocits i osteòcits. L'origen d'aquestes cèl·lules és incert, ja que podrien provenir del moll d'os, de la membrana sinovial o del greix present a l'articulació ovina. Aquests progenitors són els que han participat en la regeneració i confirmen la importància que té el microambient generat per el nínxol en la regeneració de lesions osteocondrals (Koga et al. 2007). L'estratègia d'utilització de biomatrius sense CMMA presenta certs avantatges, com els legals, evitant gran quantitats d'experimentació prèvia de colonització i caracterització del constructes i les normatives que apliquen als productes derivats de component biològic cel·lular, a més a més d'evitar problemes de rebuig immunològic, contaminacions biològiques o reaccions adverses al producte cel·lular. Malgrat no aconseguir un cartílag regenerat completament, s'està realitzant molta recerca en el disseny de biopolímers per a la regeneració de cartílag, com el disseny mitjançant el *rapid-prototyping* que es presenta com una tecnologia que fabrica matrius construïdes capa per capa i es poden modificar, a la carta, paràmetres com la mida, la forma, però encara no es controla perfectament la porositat ni l'elasticitat (Bartolo et al. 2009). El desenvolupament d'aquestes tècniques serà clau en la personalització de les teràpies basades en biopolímers i biopolímers amb CMMA.

5.1.2.3. Grup de lesió osteocondral amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de cartílag articular.

Aquest és el primer dels subgrups d'estudi de l'assaig preclínic en el que s'estudia la regeneració de defectes osteocondrals mitjançant CMMA colonitzades en biomatrius de PLGA. Al capítol 1 ja s'ha comentat extensament la recerca portada a terme durant els últims anys en aquest camp. A continuació s'analitzen els resultats, a 6 i 12 mesos, de les dues densitats cel·lulars amb les que s'ha tractat els defectes osteocondrals artificials.

Es disposa de 9 peces en total en aquest subgrup d'estudi, amb 4 peces a temps 6 mesos i 5 més a 12 mesos. A la figura 5.9 es presenten els resultats dels animals tractats amb CMMA provinents de cartílag articular i eutanasiats als 6 mesos. Aquests mostren una lesió en la zona S1 amb una lleugera depressió o anivellat amb el cartílag adjacent. Les cèl·lules s'organitzen de manera diferent en funció de la posició, a la superfície hi ha cèl·lules aplanades d'aspecte poc viable, i a la zona profunda hi ha cèl·lules d'aspecte fibrocartilaginós disposades sense cap tipus d'organització. En els marges d'integració de S1, la matriu a la zona perilesional S2 (figura 5.9-H) hialina amb condrocits agrupats i poc organitzats. En dues mostres s'observa que el contingut en proteoglicans no es correspon amb les zones en amb més expressió de col·lagen II (figura 5.9- E-F).

Una altra característica és el contingut en proteoglicans i col·lagen II en S1 i S2, similar al cartílag normal adjacent, encara que en la zona d'integració entre S1 i D1 el contingut és gairebé nul (figura 5.9-H). En aquestes zones perilesionals de S1 i D1 s'observen grups de condrocits agrupats en clústers que sembla que estiguin migrant cap a la zona lesionada. En zones profundes de D3 (figura 5.9-G) hi ha zones d'os esponjós que presenten focus de metaplàsia condroide, teixit conjuntiu lax i matriu mixoide que indiquen una alta activitat cel·lular d'aquesta zona. També s'observa a l'os esponjós, en la zona D3, diverses cavitats quístiques (figura 5.9-I) buides de contingut i amplis focus de fibrosi. Aquesta formació de quist intraossi es pot observar en els canvis progressius que ocorren a l'os subcondral després d'una lesió osteocondral profunda com la que s'ha realitzat en aquest cas (Simon et al. 2009).

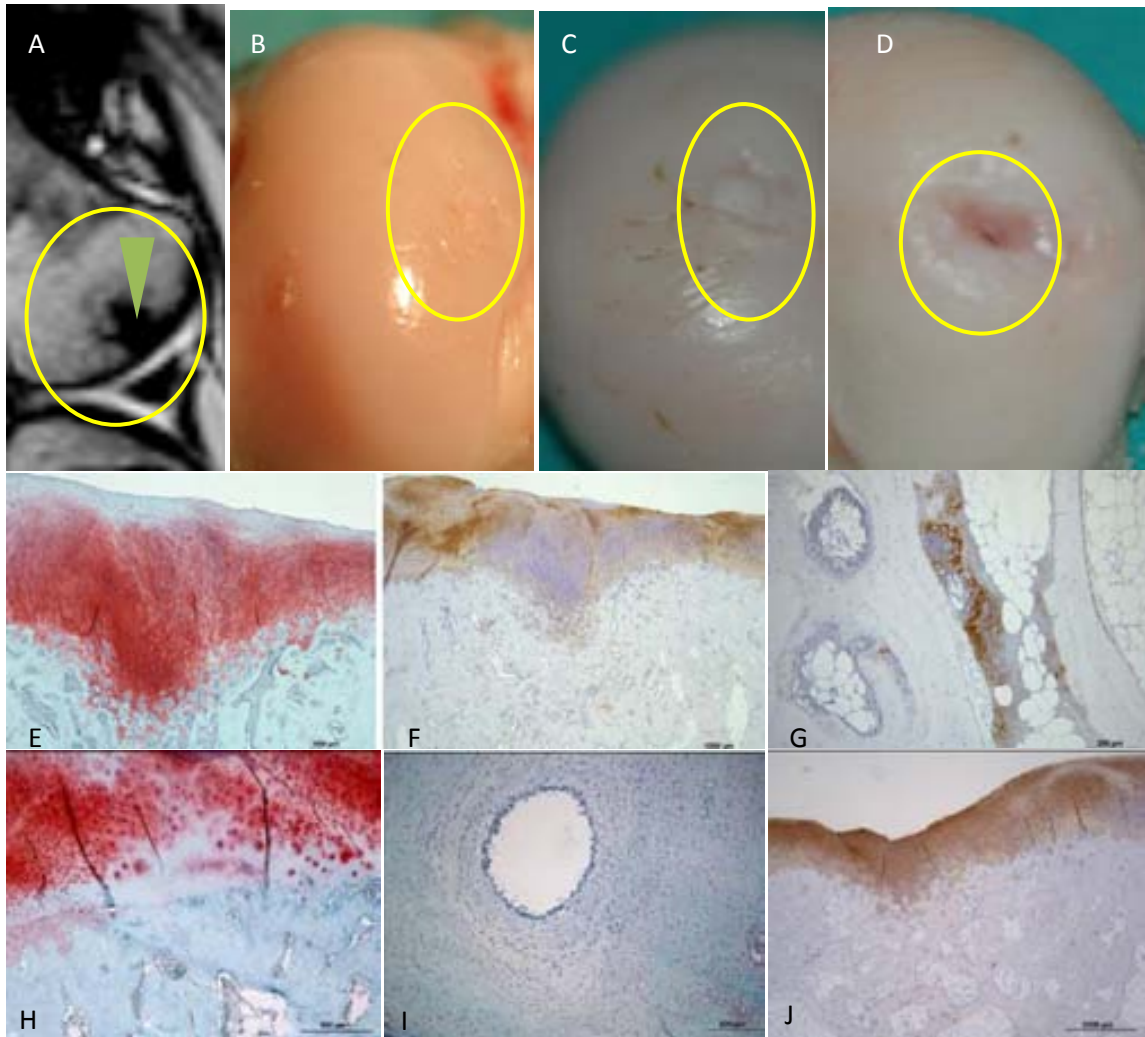


Figura 5.9. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular, als 6 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F63 CLD) i imatge macroscòpica (B- F63 CLD; C-F63 CME; D-F57 CLE) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Safranina O (E- F63 CME; H-I: F57 CLE) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (F-G: F63 CME; J-F58 CLD). Barra d'escala: E: 500µm; F: 1000µm; G: 200µm; H: 500µm; I: 200µm; J: 1000µm.

La valoració macroscòpica presenta un interval que va des de 3,33/10 fins a 9,33/10. Hi ha lesions que s'han reparat i es troben anivellades i normocolorejades (figura 5.9-B), i d'altres presenten grans depressions còncaues amb una coloració diferent al cartílag adjacent (figura 5.12-D). En termes de reparació, es pot observar una reparació incompleta amb superfícies que presenten fissures importants i una coloració menys brillant (figura 5.9-C). Les imatges de RMN mostren un lesió subcondral de morfologia, entre d'altres, com la triangular (figura 5.9-A), en forma de falca o còncaua, però sempre amb un aspecte escleròtic amb edema ossi mínim, associat evidenciat per hipersenyal STIR. Aquestes senyals de ressonància són compatibles amb la lesió objecte d'estudi, una matriu implantada sense edema ossi associat i reacció escleròtica òssia

associada. No s'observen indicis d'embassament sinovial, el que fa pressuposar una correcta adherència del implant

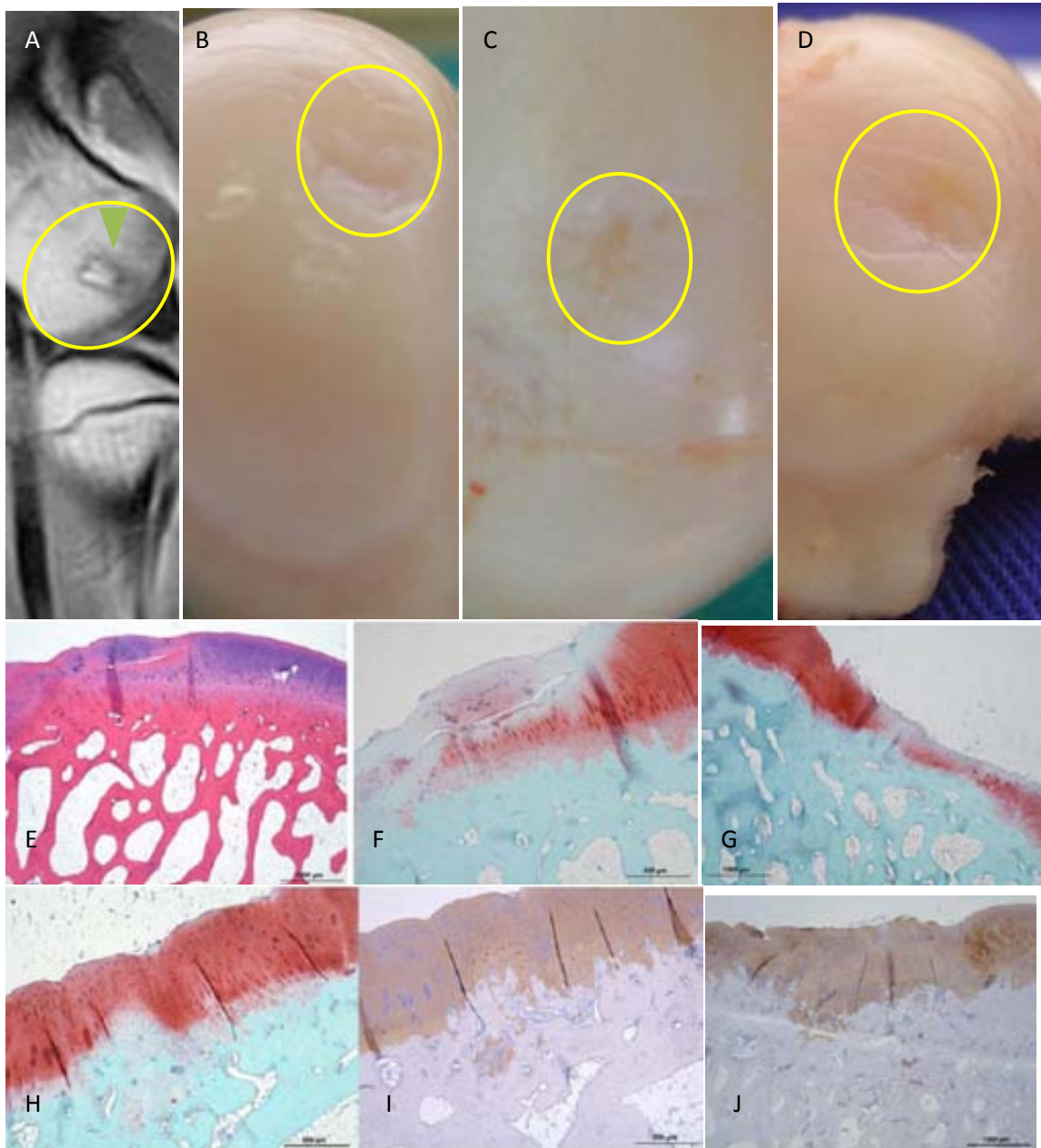


Figura 5.10. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular, als 12 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F61 CLE) i imatge macroscòpica (B- F61 CMD; C-F59 CLD; D-F52 CMD) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Hematoxilina-Eosina (E- F61 CLE), Safranina O (F-F61 CLE; H-F52 CMD; G- F59 CLD) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (I- F52 CMD; J-F61 CMD). Barra d'escala: E: 1000µm; F: 500µm; G: 1000µm; H: 500µm; I: 500µm; J: 1000µm.

En el cas dels animals sacrificats als 12 mesos si s'observa una zona S1 de la lesió més uniforme i anivellada en la majoria dels casos (figura 5.10-E). Les zones S1 i S2 estan formades en la majoria dels casos per cartílag hialí, amb condrocits disposat en columnes en la zona

profunda de S1, i més agrupats en la porció mitjana i superficial (figura 5.13-F). L'os subcondral en D1 i D2 presenta un aspecte similar que el normal en S3, evidenciant una regeneració òssia completa. La zona perilesional (S2) presenta una matriu hialina i predominen els grups grans amb condrocits que prenen una orientació dirigida cap al centre de la lesió, on és possible que migrin per facilitar la regeneració. En alguns casos (figura 5.10-F i G) el contingut en proteoglicans és escàs a la zona superficial de S1, que coincideixen amb zones d'escassa cel·lularitat, i més nombros a la zona on els condrocits estan disposats en columnes. En canvi, el col·lagen II presenta un patró de distribució semblant al cartílag articular normal adjacent en la majoria dels casos (figura 5.10-I i J). El territori profund D1 presenta una expansió de S1 en alguns casos (figura 5.10-J) amb un focus de cartílag hialí i diverses trabècules de cartílag calcificat en l'os subcondral, per tant la línia de marea desapareix en aquesta zona, així com el cartílag calcificat.

Amb aquest tractament s'aconsegueixen reparacions pràcticament complertes del teixit cartilaginós en alguns animals, amb valoracions de 10/10 en dos casos (figura 5.10. B i D), amb el cartílag anivellat amb la superfície no lesionada adjacent i amb normocoloració. En els casos de no estar anivellat i presentar fissures importants (figura 5.10-C), la puntuació baixa fins a 4-6/10. A la RMN (figura 5.10-A) s'observa una lesió de morfologia rectangular en pla sagital d'aspecte tunelitzat i que globalment presenta hipersenyal central i hiposenyal perifèrica en totes les potenciacions que podria correspondre a lesió objecte d'estudi i esclerosi perifèrica. En la resta d'imatges no s'observa edema ossi perilesional ni s'aprecia irregularitat suggestiva de lesió condral significativa, amb una morfologia irregular que presenten una senyal heterogènia en T1 i hiposenyal en T2, compatibles amb lesions osteocondrals parcialment regenerades.

A la taula 5.11 es mostren resumits els resultats de les diferents valoracions que s'han realitzat per avaluar la regeneració del defecte osteocondral mitjançant PLGA amb CMMA provinents de cartílag articular. Pel que fa a la valoració macroscòpica, s'obtenen unes mitjanes de 7.1 ± 2.6 per als còndils avaluats als 6 mesos i $7.5 \pm 3,0$ per als avaluats als 12. Si es compara amb els controls i el tractament amb PLGA sense CMMA, el tractament amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de cartílag hialí resulta, segons la valoració macroscòpica, superior en els dos casos i en els diferents temps analitzats. En les mostres analitzades a 6 mesos, aquesta valoració també és superior a la obtinguda amb les CMMA provinents de teixit adipós (3.7 ± 2.9), i les CMMA provinents de moll d'os (3.9 ± 3.2). En canvi, als 12 mesos, la valoració és lleugerament inferior al

tractament amb CMMA provinent de moll d'os (7.7 ± 2.5), però superior a les provinents de teixit adipós (5.5 ± 3.1). A nivell d'expressió de proteïnes bàsiques per a la regeneració hialina, el contingut en col·lagen II és superior als 12 mesos i a nivell individual, les mostres que presenten una expressió excel·lent amb una puntuació màxima són les biomatrius que es van colonitzar amb alta densitat (F58CLD, F52CMD). La tinció de Safranina O mostra indirectament la composició de la matriu extracel·lular i indica la quantitat de proteoglicans que s'han sintetitzat, on s'observa el mateix comportament, els animals que obtenen la màxima puntuació són els mateixos que en el cas del col·lagen II (F58CLD, F52CMD).

Si es realitza una anàlisi percentual de les diferents valoracions, en els resultats macroscòpics als 6 mesos, s'obté un 71% de la puntuació màxima, i en el cas dels histològics, el tant per cent és es molt inferior, amb una disminució fins al 37.8%. En canvi, als 12 mesos la valoració macroscòpica disminueix mínimament respecte als 6 mesos fins al 68%, i al 50% en la histològica. Les diferències entre la valoració macroscòpica i la histològica, notablement diferents als 6 mesos, amb una diferència absoluta d'un 33.2%, denoten una falta de correlació entre ambdues.

Taula 5.11. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de cartílag articular. Avaluació de la membrana sinovial, de l'aspecte macroscòpic i de les característiques microscòpiques.

	Macroscòpica	Histològica	Safranina O	Col·lagen tipus II	Membrana sinovial
Mostres avaluades als 6 mesos					
F63 CLD 0.93E+06 CMMA	9.33±0,00/10	4/18	2/4	1/4	0/4
F63 CME 1.34E+06 CMMA	7.33±0,04/10	8/18	3/4	1/4	0/4
F57 CLE 3.96E+06 CMMA	8.33±0,40/10	4/18	2/4	3/4	0/4
F58 CLD 3.90E+06 CMMA	3.33±0,40/10	11/18	3/4	4/4	0/4
Mostres avaluades als 12 mesos					
F61 CLE 0.74E+06 CMMA	10/10	11/18	2/4	2/4	0/4
F61 CMD 1.40E+06 CMMA	10/10	7/18	2/4	3/4	0/4
F59 CLD 3.72E+06 CMMA	4/10	9/18	2/4	3/4	0/4
F52 CMD 4.20E+06 CMMA	6/10	10/18	4/4	4/4	0/4
F44 CLE 3.96E+06 CMMA	4/10	8/18	4/4	2/4	0/4

Durant els últims anys s'han investigat noves estratègies per millorar les tècniques de TAC, intentant disminuir els efectes secundaris i els resultats indesitjats com la hipertròfia condral, la pèrdua dels fragments de periosti o la generació d'un fibrocartílag en comptes de cartílag hialí. En aquest estudi, el primer avantatge que s'obté amb l'estratègia utilitzada és la disminució de les complicacions secundàries derivades de la realització d'una artrotomia per a l'implantació dels tractaments. En el cas del TAC es realitza una artrotomia, però en aquest assaig preclínic s'ha desenvolupat tota la tecnologia de biomatrius pensant amb la seva utilització i implantació de forma artroscòpica, disminuint en un 26% les complicacions secundàries als tractaments convencionals de TAC (Erggelet et al. 2003). S'ha demostrat que la tècnica d'artroscòpia redueix el dolor postoperatori i disminueix els temps de recuperació dels pacients en comparació a el TAC (Kon et al. 2009). En general l'artroscòpia presenta avantatges com la reducció de la morbiditat postoperatoria, les incisions són petites amb una menor resposta inflamatòria, redueix les complicacions secundàries i els costos hospitalaris.

A la pràctica totalitat dels animals s'observa una correcta implantació i reabsorció total de les biomatrius de PLGA, tant a les imatges histològiques com a les resonàncies efectuades per a l'avaluació. Malgrat que la línia de marea en molts casos desapareix o és irregular, cap mostra presenta el cartílag regenerat separat de l'os regenerat, indicant que la unió entre les dues fases ha resistit les immediates càrregues a les que van ser sotmesos els animals, ja que hores després de la cirurgia els animals tenien llibertat de moviment perquè no es va considerar la immobilització inicial per a la consolidació de la implantació de la matriu. Aquesta és una dada clínica important perquè el moviment i la càrrega de les articulacions tractades pot promoure la regeneració i reparació del cartílag afectat (Chiang et al. 2010).

5.1.2.4. Grup de lesió osteocondral amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de teixit adipós.

En aquest subgrup d'estudi de l'assaig preclínic, s'estudia la regeneració de defectes osteocondrals mitjançant CMMA provinents de teixit adipós, colonitzades en biomatrius de PLGA. Cal mencionar que no hi ha estudis publicats en que s'hagi avaluat aquesta aproximació amb CMMA provinents de teixit adipós oví combinades amb una biomatriu de PLGA. A continuació

s'analitzen els resultats, a 6 i 12 mesos, de les dues densitats cel·lulars amb les que s'ha intentat regenerar els defectes osteocondrals artificials.

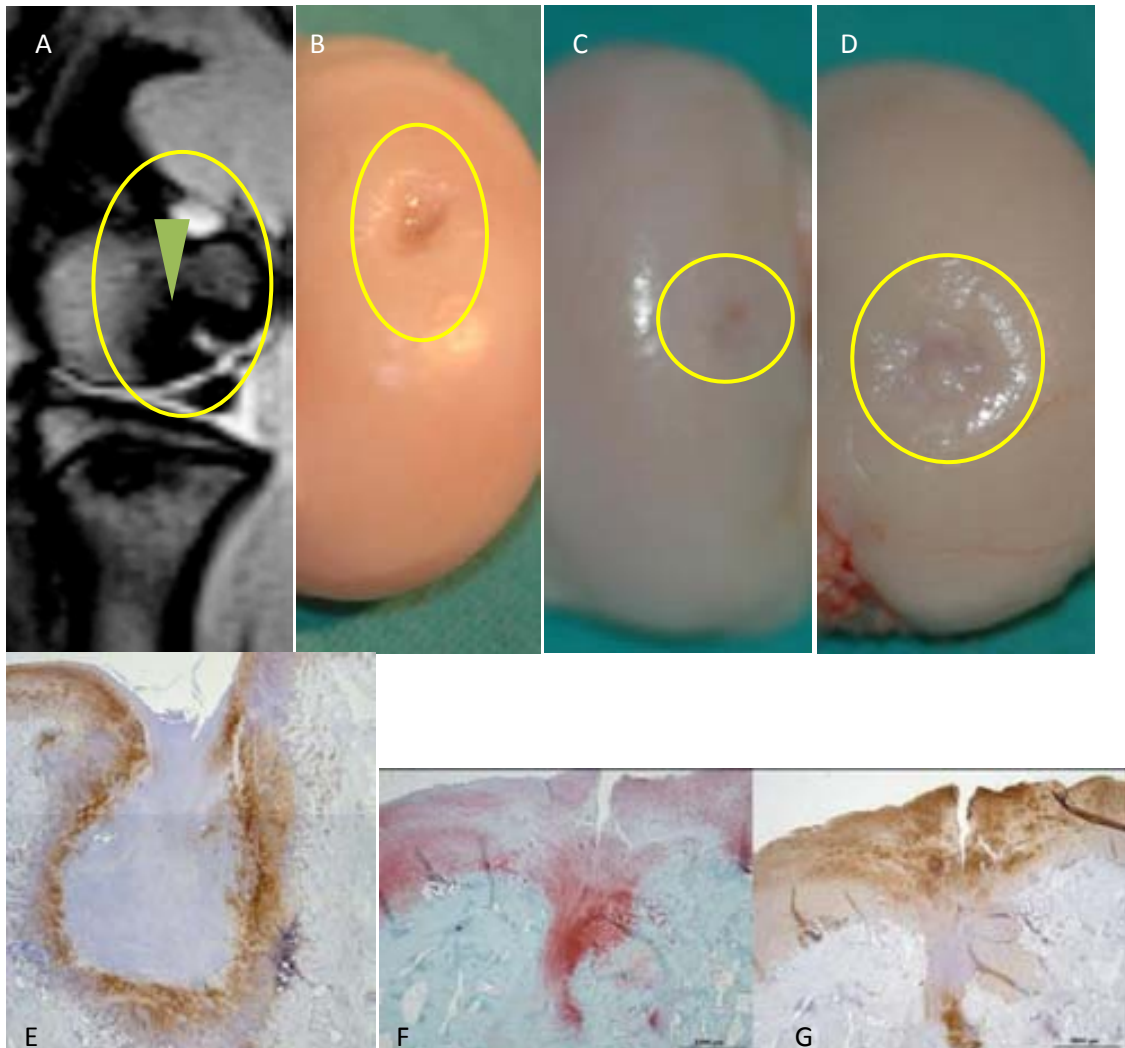


Figura 5.11. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de teixit adipós, als 6 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F63 CMD) i imatge macroscòpica (B-F63 CMD; C-F57 CME; D-F58 CMD) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Safranina O (F- F58 CMD) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (E-F63 CMD; G-F58 CMD). Barra d'escala: E: 500 μ m; F: 1000 μ m; G: 1000 μ m.

Els resultats d'aquest subgrup d'estudi als 6 mesos mostren una marcada depressió en la superfície articular i a mesura que s'aprofundeix cap a D1, predomina el teixit fibrocartilaginós, altament cel·lular, on els condrocits es disposen aïllats, desorganitzats i alguns condrocits presenten un aspecte necròtic. La zona D1 està constituïda superficialment per un teixit fibrino-necròtic amb cèl·lules d'escassa viabilitat i en els marges laterals s'aprecia necrosi del que podrien ser estructures vasculars (figura 5-11-E). En altres mostres d'aquest subgrup la zona S1 presenta un gruix similar al cartílag adjacent normal, encara que presenta unes fissures perpendiculars a la

superfície (figura 5.11-F i G). La part superficial de S1 està constituïda per una matriu hialina que conté grups de condrocits. La porció profunda de S1 es continua amb el territori D1 i està formada per una matriu amb algunes àrees cartilaginoses i altres més fibroses, ambdues d'alta densitat cel·lular. Com s'ha observat en altres casos, a la zona S2 la matriu és més hialina i conté cèl·lules aïllades o en grups que es disposen lleugerament inclinades cap a S3 en una espècie de migració cel·lular.

Els pitjors resultats de l'experiment en global, respecte a la valoració macroscòpica, s'obtenen amb aquest tractament amb PLGA+CMMA de teixit adipós amb una puntuació que va des de 2.66/10 fins a 7/10. A la lesió es pot observar un forat (figura 5.11-B) que no cobreix el cartílag o grans depressions a la zona de la lesió que no s'integren amb el cartílag adjacent (figura 5.11-D).

Les imatges de RMN corroboren els resultats dolents en l'intent de regeneració, on s'observa una lesió important on hi ha el defecte osteocondral, marcadament escleròtica amb presència d'un centre amb hipersenyal T2 / STIR suggestiva de geoda amb afectació clara de la làmina subcondral discontinua. La senyal mostra una important reacció edematosa/inflamatòria òssia amb pèrdua de la trabeculació òssia normal, i incipient formació de zona de quist/necrosi òssia associats a lesió objecte d'estudi.

En els resultats d'aquest mateix subgrup s'observa una millora significativa als 12 mesos de tractament. Els resultats de l'avaluació histològica mostren una lesió a la zona S1 presenta una lleugera depressió en relació al cartílag normal adjacent, però no tant deprimat com als 6 mesos. En alguns casos (figura 5-12-I) presenta una superfície irregular amb fissures verticals que arriben a la porció mitjana del cartílag articular, però ben integrat a les zones perilesionals S2 i S3. El teixit predominant és el cartílag hialí, encara que en alguns punts en la unió amb l'os subcondral i en la superfície apareix un teixit d'aspecte més fibrós (figura 5-12-H). Hi ha una bona integració de la matriu a la zona lesionada ben delimitada amb S3 per cartílag hialí on els condrocits es disposen en columnes orientades cap a la superfície o lleugerament inclinades cap a S1. L'os subcondral en D1 i D2 presenta un gruix superior al normal i les trabècules òssies augmentades de mida (figura 5-12-I), llavors es perd la línia de marea. Malgrat que presenta un gruix anormal, l'aspecte és

normal, però en profunditat a la zona D3 existeix un ampli focus de fibrosi on s'observen alguns grups d'adipòcits (figura 5.12-E). En alguns casos el contingut en proteoglicans és gairebé nul a la zona de la lesió que ha quedat acel·lular a S1 (figura 5-12-G), en canvi, el col·lagen II a la zona superficial i mitja de la lesió és lleugerament superior al que mostra el cartílag no lesionat.

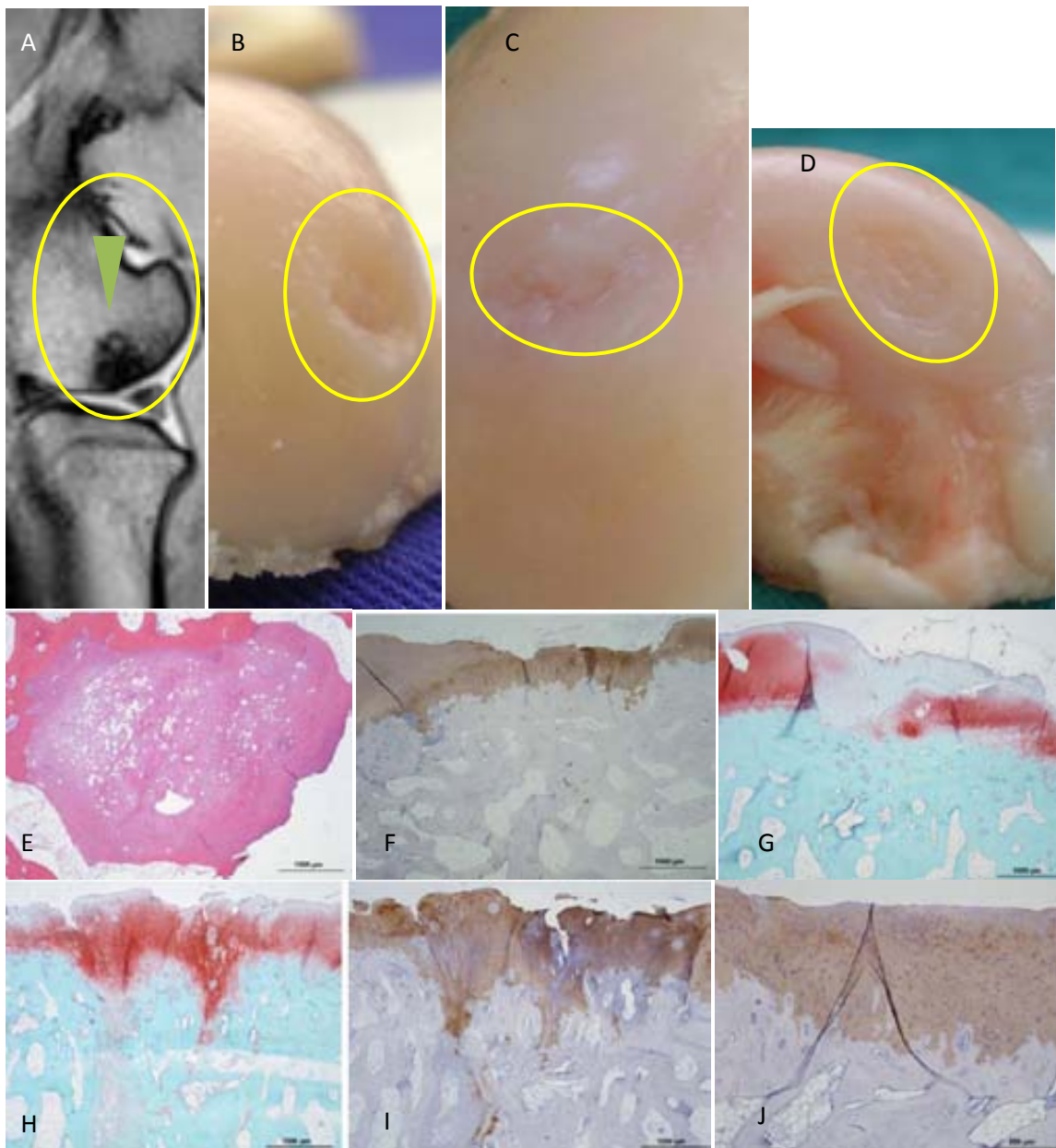


Figura 5.12. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de teixit adipós, als 12 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F59 CME) i imatge macroscòpica (B-F52 CME; C-F59 CMD; D-F61 CLD) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Hematoxilina-Eosina (E- F52 CME), Safranina O (F-F61 CLD; H-F59 CMD; G- F52 CME) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (I- F59 CMD; J-F61 CLD). Barra d'escala: E: 1000µm; F: 1000µm; G: 1000µm; H: 1000µm; I: 1000µm; J: 500µm.

La valoració histològica és superior als 12 mesos en comparació amb els animals sacrificats als 6 mesos. S'observa el mateix en la valoració macroscòpica, obtenint un rang de puntuacions entre 3/10 i 10/10. Els resultats mostren des d'una lesió reparada, anivellada i totalment integrada (figura 5.12-D), fins a grans fissures (figura 5.12-C) o depressions (figura 5.12-B) sense integració amb el cartílag adjacent.

En canvi les imatges de RMN no mostren una gran millora, ja que en alguns dels casos s'observa una lesió de morfologia pseudonodular (figura 5.12-A), localitzada en l'aspecte caudomedial amb una irregularitat més marcada dels seus marges, així com de la superfície condilar i de la zona de cartílag associat a la formació geodes però sense observar-se'n. En els casos de 6 mesos si s'observaven aquestes geodes, en el que sembla una regeneració parcial d'aquestes lesions intraòssies als 12 mesos.

A la taula 5.12 es mostren resumits els resultats de les diferents valoracions que s'han realitzat per avaluar la regeneració del defecte osteocondral mitjançant PLGA amb CMMA provinents de teixit adipós. Pel que fa a la valoració macroscòpica, s'obtenen unes mitjanes de 3.7 ± 2.9 per als còndils avaluats als 6 mesos i 5.5 ± 3.1 per als avaluats als 12, sent aquest subgrup és el que pitjor puntuació obté en quan a la valoració macroscòpica. Tanmateix, s'observa una millora relacionada amb el temps d'un 48% entre els tractaments a 6 i 12 mesos. Aquesta millora temporal també s'observa a la valoració histològica, on malgrat els resultats no són molt millors, amb una mitjana de 5.7 ± 3.2 als 6 mesos i 8.3 ± 1.3 als 12, representen un resultats dolents, només comparables a 6 mesos amb el tractament amb CMMA provinent de moll d'os (4.7 ± 2.2) o al grup control amb biomatriu (7.5 ± 0.7) a 6 mesos.

En les mostres analitzades a 12 mesos destaca la mostra F61CLD com el que obté la millor puntuació global, tant en valoració macroscòpica com histològica. El fet d'obtenir puntuacions tan baixes en la valoració histològica en aquest subgrup, i tan bones en el grup control, junt amb els resultats obtinguts en aquest mateix animal (F61), independentment de la font cel·lular utilitzada, fa pensar en diferències individuals que promouen la regeneració en alguns animals més que d'altres (Im et al. 2001).

Taula 5.12. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de teixit adipós. Avaluació de la membrana sinovial, de l'aspecte macroscòpic i de les característiques microscòpiques.

	Macroscòpica	Histològica	Safranina 0	Col·lagen tipus II	Membrana sinovial
Mostres avaluades als 6 mesos					
F63 CMD 0.98E+06 CMMA	2.66±0.00/10	2/18	0/4	0/4	0/4
F57 CME4.50E+06 CMMA	1.33±0.40/10	8/18	3/4	3/4	0/4
F58 CMD 3.54E+06 CMMA	7.00±0.40/10	7/18	1/4	3/4	0/4
Mostres avaluades als 12 mesos					
F61 CLD 1.07E+06 CMMA	10/10	9/18	2/4	2/4	0/4
F52 CME 1.01E+06 CMMA	3/10	9/18	0/4	2/4	0/4
F59 CMD 2.58E+06 CMMA	4/10	7/18	3/4	3/4	0/4

Si es realitza una anàlisi percentual de les diferents valoracions en els resultats macroscòpics als 6 mesos, s'obté un 37% de la puntuació màxima, i en el cas dels histològics el tant per cent és inferior, amb una disminució de 5 punts percentual fins al 31.7%. En canvi, als 12 mesos la valoració macroscòpica augmenta considerablement respecte als 6 mesos fins al 55%, i al 48.3% en la histològica. En aquest cas, les diferències entre la valoració macroscòpica i la histològica són similars, a diferència del cas del tractament amb CMMA provinents de cartílag articular, on les diferències percentuals entre la valoració macroscòpica i la histològica arriben fins a 33 punts percentuals als 6 mesos, en canvi, en aquest subgrup d'estudi les diferències, tant a 6 com a 12 mesos, no superen els 6 punts percentuals. En aquest subgrup no s'observen diferències entre les dues densitats cel·lulars utilitzades.

5.1.2.5. Grup de lesió osteocondral amb PLGA colonitzat de CMMA provinents de moll d'os.

En aquest subgrup de l'assaig preclínic, s'estudia la regeneració de defectes osteocondrals mitjançant CMMA provinents de moll d'os, colonitzades en biomatrius de PLGA. A continuació s'analitzen els resultats, a 6 i 12 mesos, de les dues densitats cel·lulars amb les que s'ha intentat regenerar els defectes osteocondrals artificials. L'aplicació d'aquest tractament durant 6 mesos mostra un resultat similar als que s'han observat amb el tractament amb CMMA provinents de teixit adipós. S'observa una lesió a la zona S1 amb una marcada depressió, similar a la de la figura 5.11-E dels còndils tractats amb CMMA provinents de teixit adipós. La superfície de

la depressió de S1 està formada per un teixit fibrino-necròtic amb restes cel·lulars que es continua en profunditat amb D1 mitjançant teixit fibrós vascularitzat, fent desaparèixer la línia de marea en aquesta zona. En aquest cas també s'observa que la zona (figura 5.13-E) que envolta aquest teixit fibrós és l'única que presenta tinció positiva per a proteoglicans i col·lagen II. L'estructura no es correspon amb el cartílag normal en 3 dels casos estudiats en aquest subgrup. Una de les peces que es va introduir (figura 5.13-F), va presentar problemes a l'hora d'introduir-la a la lesió artificial mitjançant artroscòpia ja que la matriu es va desintegrar en 3 fragments diferents, però el cirurgià va aconseguir recollir-los tots i impactar-los a dintre de la lesió generada. Tal i com es comenta més endavant, no es considera que aquest fet tingués una gran repercussió en el resultat final, ja que les imatges d'histologia revelen unes característiques semblants a altres peces que sí van ser introduïdes correctament.

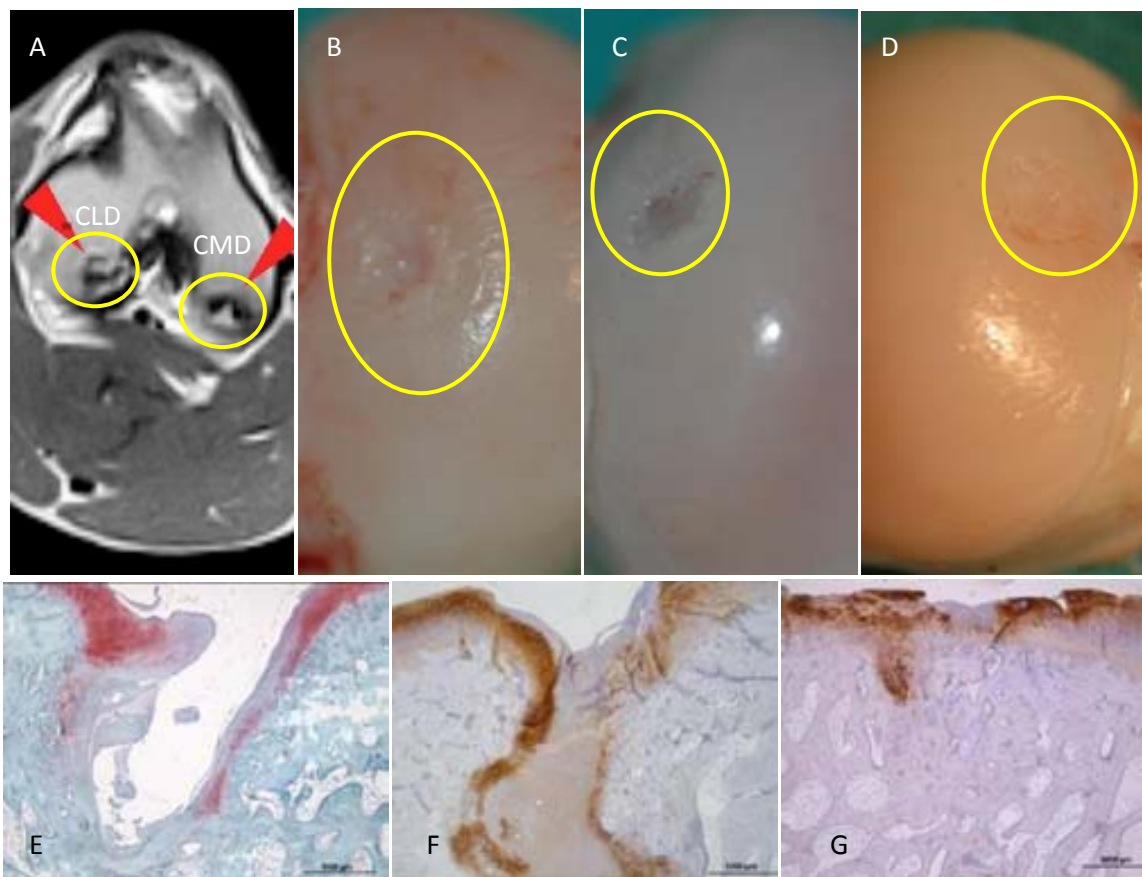


Figura 5.13. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de moll d'os, als 6 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F57 Genoll dret) i imatge macroscòpica (B-F58 CME; C-F63 CLE; D-F57 CLE) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Safranina O (E-F57 CMD) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (F- F59 CMD; G- F57 CLD). Barra d'escala: E: 1000µm; F: 1000µm; G: 1000µm.

Una de les peces analitzades als 6 mesos en el subgrups de les CMMA provinents de moll d'os és l'única amb resultats aparentment diferents als obtinguts de la resta del grups. En aquest cas el constructe va ser colonitzat amb densitat cel·lular alta. Microscòpicament s'observa (figura 5.13-G) una lesió que s'ha regenerat superficialment i apareix alineada amb el cartílag adjacent a totes les zones S, encara que presenta algunes irregularitats superficials. El contingut en proteoglicans es presenta dispers en focus a S1, S2 i D1, mentre que l'extensió de col·lagen II es presenta en àrees més àmplies en relació al contingut en proteoglicans, i es distribueix a les zones fibrocartilaginoses de S1 i D1 però, en canvi, en un dels marges d'integració de S2 el contingut és escàs, coincidint amb les zones vascularitzades.

De les 4 mostres analitzades en aquest subgrup, 3 presentaren una valoració macroscòpica dolenta, entre 1.33/10 i 3/10, ja que les lesions no es troben anivellades (figura 5.13-B) ni normocolorades (figura 5.13-C). S'observen orificis semblants als que s'han trobat en els còndils tractats amb CMMA provinents de teixit adipós, que presenten també unes imatges histològiques semblants. El còndil que resta, obté una valoració de 8/10 (figura 5.13-C) perquè sembla regenerada i integrada per totes les vores. En aquest cas, les imatges de RMN no s'observen lesions tan extenses com en el grup tractat amb CMMA provinents de teixit adipós, però si s'observen lesions de tipus crateriforme (figura 5.13-A) localitzades en l'aspecte caudomedial que globalment presenta una senyal de ressonància compatible amb la imatge que s'observa a la histologia (figura 5.13-E). Hi ha una discreta hipersenyal STIR que afecta a l'os subcondral en la perifèria lesional, compatible amb un discret edema ossi associat. Malgrat ser la lesió evident, sembla existir una correcta integració, en les seccions realitzades, entre l'implant i l'os subcondral, sense evidenciar fuites de líquid sinovial. A la mateixa figura 5.13-A, en el CLD sembla predominar la hiposenyal en totes les potenciacions suggerint la presència de teixit tipus fibrocartilaginós.

L'últim subgrup que s'analitza és el tractat amb CMMA provinents de moll d'os durant 12 mesos. Cal destacar la figura 5.14-B i 5.14-E, que correspon a l'animal F61 CME, on es mostra la regeneració i alineació perfecta del cartílag derivat del tractament amb PLGA+CMMA provinent de moll d'os.

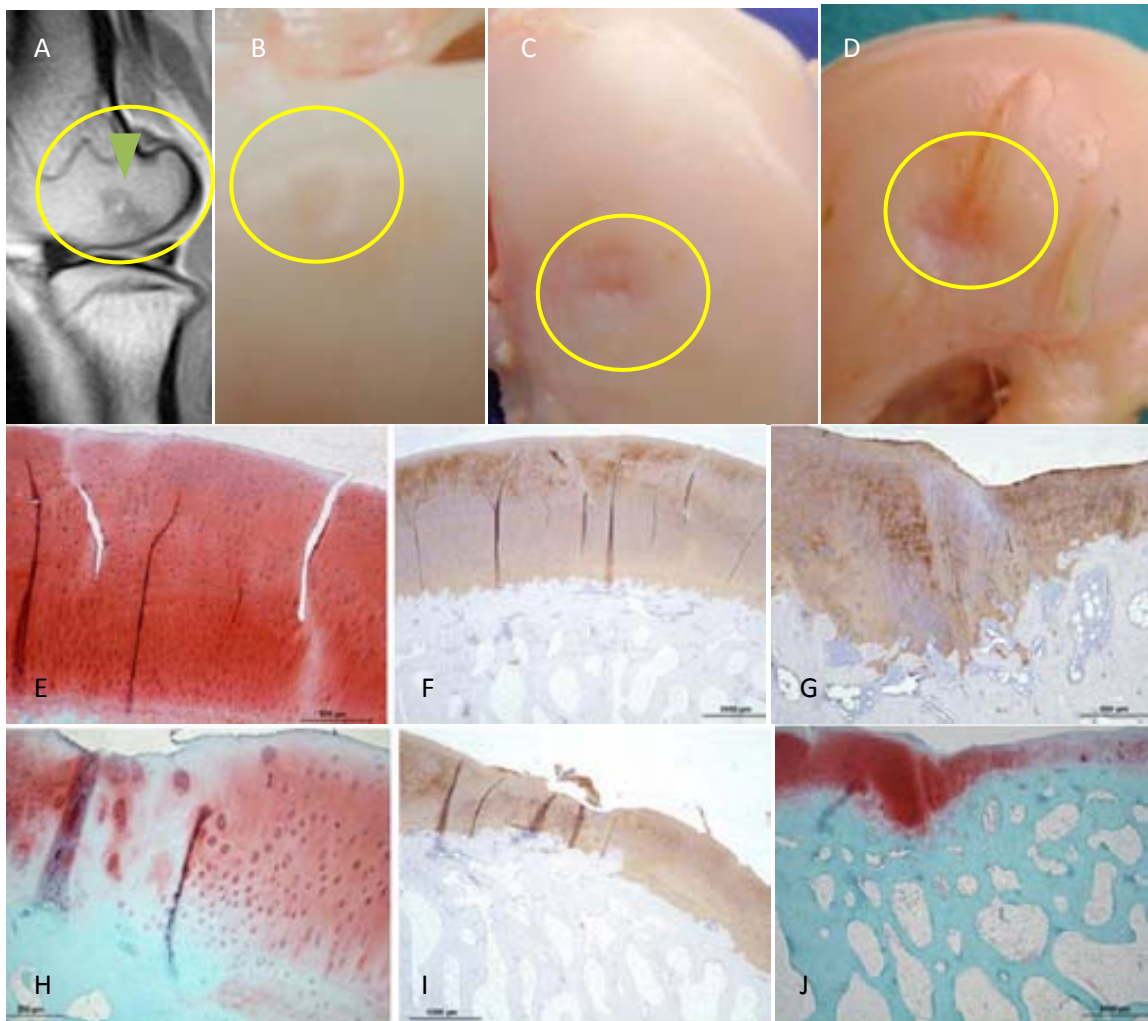


Figura 5.14. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMEA provinents de moll d'os, als 12 mesos post-implantació. A-D: Imatge de RMN (A-F61 CME) i imatge macroscòpica (B- F61 CME; C-F52 CLD; D-F59 CME) (encerclat en groc la zona de la lesió); E-G: Imatges d'histologia corresponents a Safranina O (E- F61 CME; H-F59 CME; J- F52 CLD) i immunohistoquímica per a col·lagen tipus II (F-F61 CME; G- F52 CLD; I-F59 CME). Barra d'escala: E: 500µm; F: 1000µm; G: 500µm; H: 200µm; I: 1000µm; J: 1000µm.

Histològicament el CME de l'animal F61 (figura 5.14-E) presenta algunes fissures verticals que apareixien parcialment farcides d'una matriu més acidòfila i de menor densitat cel·lular, però en gran part de la matriu a S1 és hialina, els condrocits es disposen predominantment individuals i en columnes, excepte en les vores de les fissures on predominen els grups de condrocits. El cartílag calcificat es manté homogeni en S1 i S2 i es continua amb S3 indicant una integració completa a nivell histològic. L'os subcondral apareix normal. La puntuació obtinguda a la valoració histològica és de 17/18, la màxima obtinguda en tot l'estudi, i es considera totalment regenerat. En altres casos (figura 5.14-G), la lesió es troba parcialment anivellada amb la superfície normal adjacent, ja que hi ha un lleuger desprendiment i presència de fissures superficials, presentant, en

conjunt, un gruix inferior. El contingut en proteoglicans es troba reduït en les àrees de S1 de baixa cel·lularitat (figura 5.14-H), mentre que el col·lagen II (figura 5.14-I) també es troba reduït a la porció superficial de S1 en relació amb el cartílag adjacent normal, però en menor mesura que els proteoglicans. S'observa clarament la correspondència entre la zona tenyida pels proteoglicans (figura 5.14-G) amb la zona tenyida per el col·lagen II (5.14-J), coincideixen en gran part, excepte que el col·lagen tipus II s'estén per més superfície, fins a l'os subcondral on sembla que es troba en un procés d'ossificació endocondral.

Els millors valors de l'avaluació macroscòpica s'obtenen amb el tractament de CMMA provinents de moll d'os durant 12 mesos, variant des de 5/10 fins a 10/10. Només es disposa de 4 mostres, però l'aspecte és de total regeneració (figura 5.14-B). Les lesions presenten normocoloració i anivellades (figura 5.14-C), encara que alguna mostra fissures amb un aspecte de falta d'integració en algunes zones (figura 5.14-D). Les imatges de RMN (figura 5.14-A) corroboren els bons resultats on les lesions que s'observen són petites, de marges mal definits i localització subcondral, caracteritzades per lleugera hiposenyal T1, hiposenyal T2 i sense canvis en seqüències STIR. A nivell de cartílag no s'observen irregularitats i la lesió que s'observa no provoca cap alteració morfològica en la superfície condilar. Aquestes característiques fan pensar que la lesió s'ha regenerat i no hi ha cap alteració morfològica significativa de la superfície condilar.

A la taula 5.13 es mostren resumits els resultats de les diferents valoracions que s'han realitzat per avaluar la regeneració del defecte osteocondral mitjançant PLGA amb CMMA provinents de moll d'os. Pel que fa a la valoració macroscòpica, s'obtenen unes mitjanes de 3.9 ± 3.2 per als còndils avaluats als 6 mesos i 7.7 ± 2.5 per als avaluats als 12. Si es comparen els diferents subgrups estudiats, en les mostres analitzades a 6 mesos la valoració de les CMMA provinents de moll d'os és la pitjor de totes, en canvi, als 12 mesos, la valoració és superior a la lesió control (7 ± 4.2), al tractament amb CMMA provinent de cartílag articular (6.8 ± 3.0), al tractament amb CMMA provinent de teixit adipós (5.5 ± 3.1) i al control amb PLGA (4 ± 2.8). Aquesta diferència temporal representa una millora del 97% als 12 mesos respecte als 6 primers, sent així la major milloria temporal que s'ha observat en el global de l'assaig preclínic.

Pel que fa a la valoració histològica, també s'observa una millora del 250% entre els dos millors valors de cada grup temporal, fins i tot superior a la observada en la valoració macroscòpica, amb una mitjana de 4.5 ± 1.7 als 6 mesos i 11.3 ± 4.8 als 12. Un cop més la valoració histològica als 6 mesos és la més baixa de totes, en canvi als 12 mesos és la més alta. Cal remarcar un cop més l'animal F61, que en aquest subgrup també obté la màxima valoració global, tant macroscòpica com histològica, de fet, en aquest cas es pot afirmar que la peça F61CME amb 4.92×10^4 CMMA provinents de moll d'os és un cartílag normal, totalment regenerat.

Taula 5.13. Resultats corresponents als còndils tractats amb PLGA colonitzada amb CMMA provinents de moll d'os. Avaluació de la membrana sinovial, de l'aspecte macroscòpic i de les característiques microscòpiques.

	Macroscòpica	Histològica	Safranina 0	Col·lagen tipus II	Membrana sinovial
Mostres avaluades als 6 mesos					
F58 CME $1.35E+06$ CMMA	$2.66 \pm 0,40/10$	4/18	1/4	0/4	0/4
F63 CLE $1.35E+06$ CMMA	$3.00 \pm 0,70/10$	3/18	0/4	0/4	0/4
F57 CMD $3.18E+06$ CMMA	$1.3 \pm 0,40/10$	4/18	0/4	4/4	0/4
F57 CLD $4.86E+06$ CMMA	$8.66 \pm 0,40/10$	7/18	1/4	2/4	0/4
Mostres avaluades als 12 mesos					
F59 CME $1.40E+06$ CMMA	5/10	8/18	1/4	3/4	0/4
F52 CLD $3.24E+06$ CMMA	8/10	10/18	3/4	2/4	0/4
F61 CME $4.92E+06$ CMMA	10/10	17/18	4/4	2/4	0/4
F44 CME $4.50E+06$ CMMA	5/10	10/18	2/4	3/4	0/4

Si es realitza una anàlisi percentual de les diferents valoracions, en els resultats macroscòpics als 6 mesos, s'obté un 39% de la puntuació màxima, i en el cas dels histològics el tant per cent és inferior, amb una disminució de 13 punts percentual fins al 26.1%, en canvi als 12 mesos la valoració macroscòpica augmenta considerablement respecte als 6 mesos fins al 77%, i al 65% en la histològica. A l'igual que en el subgrup de CMMA de teixit adipós, les diferències entre la valoració macroscòpica i la histològica són similars, a diferència del subgrup CMMA provinents de cartílag articular, on les diferències percentuals entre la valoració macroscòpica i la histològica arriben fins a 33 punts percentuals als 6 mesos, en canvi en aquest subgrup d'estudi les diferències, tant a 6 com a 12 mesos no superen els 12 punts percentuals. En aquest subgrup

no s'observen diferències entre les dues densitats cel·lulars utilitzades, però sí entre els diferents temps de tractament.

Les imatges histològiques de les peces analitzades a 6 mesos són molt similars entre elles, amb un recobriment de la lesió per part d'un teixit fibrinós que no ocupa la totalitat de l'espai i deixa un forat, generant una incongruència que pot comportar problemes de degeneració articular. Aquestes imatges recorden a les lesions controls de diferents treballs que generen defectes osteocondrals similars al realitzat en aquest treball (Nagura et al. 2007; Han et al. 2008), o fins i tot al còndil lesió control del experiment pilot del capítol 4. Al següent apartat es realitza una anàlisi de la comparativa entre les diferents fonts, amb els resultats ordenats per tractaments i temporalment en global.

5.2. Conclusions

En primer lloc es pot afirmar que l'assaig preclínic ha demostrat la seguretat de la teràpia desenvolupada en aquest treball, fet que es pot observar a diferents nivells. Arran dels anàlisis de les necròpsies no s'han observat lesions sistemàtiques que hagin pogut estar causades per l'administració dels diferents tractaments en els còndils femorals. Malgrat la mort d'un animal durant l'assaig, es va determinar que la causa de la mort no tenia relació amb el tractament administrat. En la pràctica totalitat dels animals analitzats no s'han detectat anomalies cel·lulars que indiqui en qualsevol tipus de transformació cel·lular cap a cèl·lules tumorals. Els hemogrames i les determinacions enzimàtiques van resultar normals en tots els animals.

Malgrat que està descrita la inflamació sinovial com a signe de degeneració articular i osteoartritis primerenca (Benito et al. 2005), no s'ha trobat cap tipus d'inflamació de la membrana sinovial a llarg termini. És possible que aquest sigui un dels efectes beneficiosos de les CMMA, que tenen capacitats immunomoduladores sobre les cèl·lules que causen la inflamació com les cèl·lules T reguladores que estan involucrades en el procés d'inflamació posterior a una lesió condral (González et al. 2009).

En segon lloc, per valorar l'eficàcia del tractament es tenen en compte exclusivament els resultats i les valoracions realitzades per clínics i anatomopatòlegs mitjançant una avaluació doble cec. L'assaig preclínic contempla dos temps d'estudi, a la taula 5.14 es resumeixen les consideracions generals sobre cada peça analitzada i el resultat que se li pot atribuir en funció de les valoracions histològiques i macroscòpiques.

A nivell de la valoració global, en aquest estudi no s'han trobat diferències importants entre el tractament de CMMA provinents de cartílag articular i les de moll d'os. Tots dos presenten animals que han regenerat completament el cartílag a nivell macroscòpic i puntuacions elevades en la valoració histològica. En tractaments que no incorporen les matrius com a suport i estructura per a la regeneració de cartílag, com poden ser el TAC, sigui quina sigui la font cel·lular, provinents de moll d'os o de cartílag articular, els resultats no milloren les condicions clíniques dels pacients a llarg termini (Nejadnik et al. 2010). En canvi, quan s'incorpora una biomatriu al tractament, la milloria és significativa, obtenint millors resultats clínics a llarg termini amb la teràpia de TACAM (Trasplant autòleg de condrocits assistit per matriu) respecte al TAC (Bartlett et al. 2005) i la microfractura (Basad et al. 2010).

Malgrat les CMMA provinents de teixit adipós han demostrat el seu potencial condrogènic (Merceron et al. 2008), aquest ha estat quantificat i no és superior al potencial demostrat per les CMMA provinents de moll d'os (Im et al. 2005). Aquesta diferència de potencialitat pot ser un dels factors que expliquin que aquest subgrup d'estudi obtingui els pitjors resultats globals de valoració de la regeneració.

Cal destacar l'animal F61 que obté la millor puntuació global amb el tractament de PLGA+CMMA provinents de moll d'os, però també és el que millor resultat obté quan s'aplica el tractament de PLGA+CMMA provinents de greix. En el tractament amb CMMA+ provinents de cartílag articular, en un dels casos regenera cartílag hialí globalment i a l'altre obté una de les millors puntuacions histològiques del grup d'estudi. Aquest resultat remarca les diferències individuals que poden promoure la regeneració en alguns animals més que d'altres (Im et al. 2001).

Taula 5.14. Resultats de la valoració global. Classificats per tractaments i temps d'avaluació. A cada quadre de la identificació del animal (FXX) està indicada la quantitat de cèl·lules que s'havia colonitzat a la matriu de PLGA. Es mostra l'avaluació histològica (H), la macroscòpica (M) i la global (en majúscules) que ha realitzat un anatomopatòleg.

Tractament	MOSTRES																										
Lesió sense tractament	6 MESOS						12 MESOS																				
	F58			F52			F59																				
	H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M										
	12	5.33		13	10		8			4																	
Valoració global	CARTÍLAG HIALÍ			FRIBRO-CARTÍLAG			GROSOR INFERIOR																				
PLGA	12 MESOS																										
	F44			F44																							
	H	M		H	M																						
	7	2		8	6																						
Valoració global	MATRIU MIXTA			CARTÍLAG HIALÍ																							
PLGA+ CMMA de cartílag articular	6 MESOS									12 MESOS																	
	F57- 3.96 E+06			F63- 1.34 E+06			F63- 0.93 E+06			F58- 3.90 E+06			F52- 4.20 E+06			F61- 0.74 E+06			F61- 1.14 E+06			F59- 3.72E+06			F44- 1.14 E+06		
	H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M	
	4	8.33		8	7.33		4	9.33		11	3.33		10	6		11	10		7	10		9	4		8	4	
Valoració global	FRIBRO-CARTÍLAG			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			CARTÍLAG HIALÍ			CARTÍLAG HIALÍ			CARTÍLAG HIALÍ			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			CARTÍLAG HIALÍ		
PLGA+ CMMA de teixit adipós	6 MESOS						12 MESOS																				
	F57- 4.50 E+06			F63- 0.98 E+06			F58- 3.54 E+06			F52- 1.01 E+06			F61- 1.07 E+06			F59- 2.58 E+06											
	H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M										
	8	1.33		2	2.66		7	7		9	3		9	10		7	4										
Valoració global	CARTÍLAG HIALÍ			INTEGRACIÓ PARCIAL			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA											
PLGA+ CMMA de moll d'os	6 MESOS									12 MESOS																	
	F57- 3.18 E+06			F57- 4.86 E+06			F-58- 1.35 E+06			F63- 1.35 E+06			F52- 3.24 E+06			F59- 1.40 E+06			F44- 4.92 E+06			F61- 4.92 E+06					
	H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M		H	M	
	7	8.66		4	1.3		4	2.66		3	3		10	8		8	5		10	5		17	10				
Valoració global	MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			MATRIU MIXTA			CARTÍLAG HIALÍ			CARTÍLAG HIALÍ			CARTÍLAG HIALÍ					

Tot els animals valorats a 6 mesos presenten un grau variable d'irregularitats, discontinuïtats o depressions en la superfície articular regenerada, independentment del tipus de teixit regenerat. Com es pot observar a la figura 5.15, només un 33% dels còndils tractats amb PLGA+CMMA provinents de teixit adipós i un 25% dels tractats amb PLGA+CMMA provinents de cartílag articular, han reparat i regenerat en forma de cartílag hialí la lesió osteocondral. La resta

de tractaments donen un resultat d'una matriu mixta que presenta algunes característiques del cartílag hialí, però també de fibrocartílag.

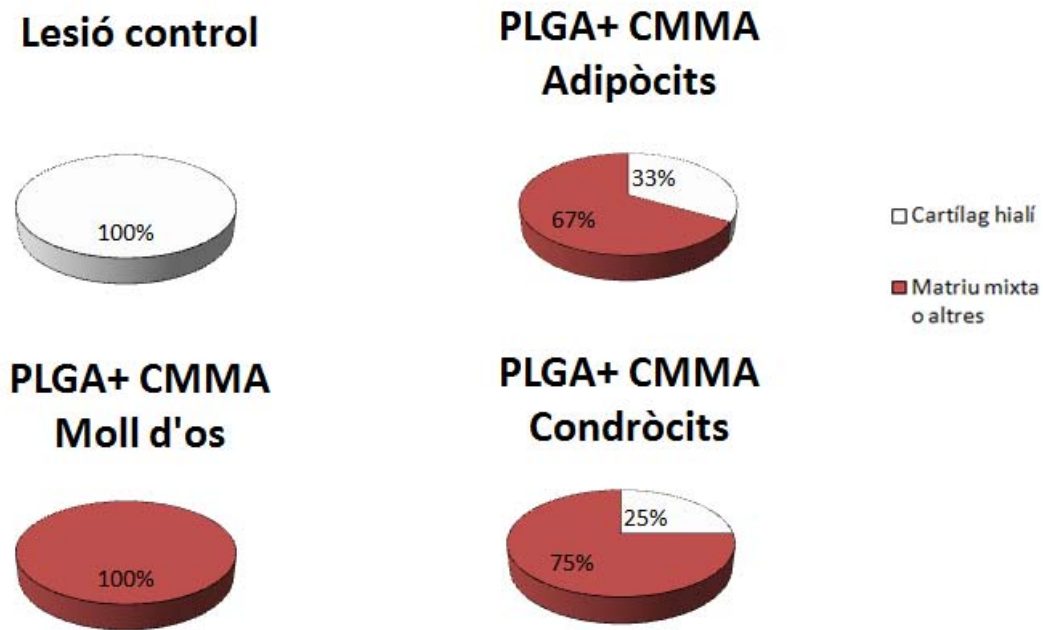


Figura 5.15. Resum dels resultats de la valoració global dels diferents tractaments aplicats als 6 mesos.

L'os subcondral de totes les mostres presenta major o menor grau de remodelació i activitat osteogènica a la zona de l'os esponjós, on fins i tot algunes presenten focus condroides en la unió osteocondral a la zona de la lesió (S1 i D1) i/o àrees de fibrosi del os subcondral en D3. Aquestes àrees de fibrosi són conseqüència d'una pèrdua de contacte entre el teixit cartilaginós i l'os arran de la lesió generada. Per obtenir una regeneració completa han de desaparèixer per donar lloc a teixit ossi. Tal i com s'havia observat a l'assaig pilot del capítol 4, s'observa una proporció variable de cartílag hialí o fibrocartílag i ossificació endocondral en els marges del teixit fibrós que omple la zona lesionada.

El tractament de llarga durada, a 12 mesos, mostra una integració del teixit regenerat al cartílag normal adjacent en la totalitat de les peces analitzades. La superfície del teixit regenerat en 14 de les mostres és irregular o presenta petites depressions. En les dues mostres restants, F52CLE (control sense tractament) presenta una superfície ben alineada i llisa, però el teixit regenerat s'assembla a fibrocartílag. L'altra mostra, F61CME (4.92E+06 CMMA de moll d'os) presenta una superfície alineada, el gruix del cartílag és molt similar al adjacent normal, amb el

que es pot considerar una regeneració completa. A la resta de les mostres, s'aprecien graus diferents de remodelació i increment de l'os subcondral a D1. En relació al contingut en proteoglicans i col·lagen II en el teixit reparat s'observa un increment en les mostres als 12 mesos de tractament, fins i tot en aquelles lesions on la matriu fibrosa és present, suggerint una possible diferenciació de les cèl·lules a condrocits del cartílag hialí.

En general els resultats milloren molt respecte al tractament de 6 mesos, ja que es pot observar a la figura 5.16 com el tant per cent de teixit tipus cartílag hialí augmenta en tots els tractaments aplicats. En el tractament a 12 mesos, el 75% dels còndils tractats amb PLGA+CMMA provinents de moll d'os, el 60% dels tractats amb PLGA+CMMA provinents de cartílag articular i el 50% dels tractats amb PLGA sol, han reparat i regenerat en forma de cartílag hialí la lesió osteocondral. Cal destacar, que en aquest cas, cap dels tractats amb PLGA+CMMA provinents de teixit adipós ha mostrat característiques histològiques semblants al cartílag articular.

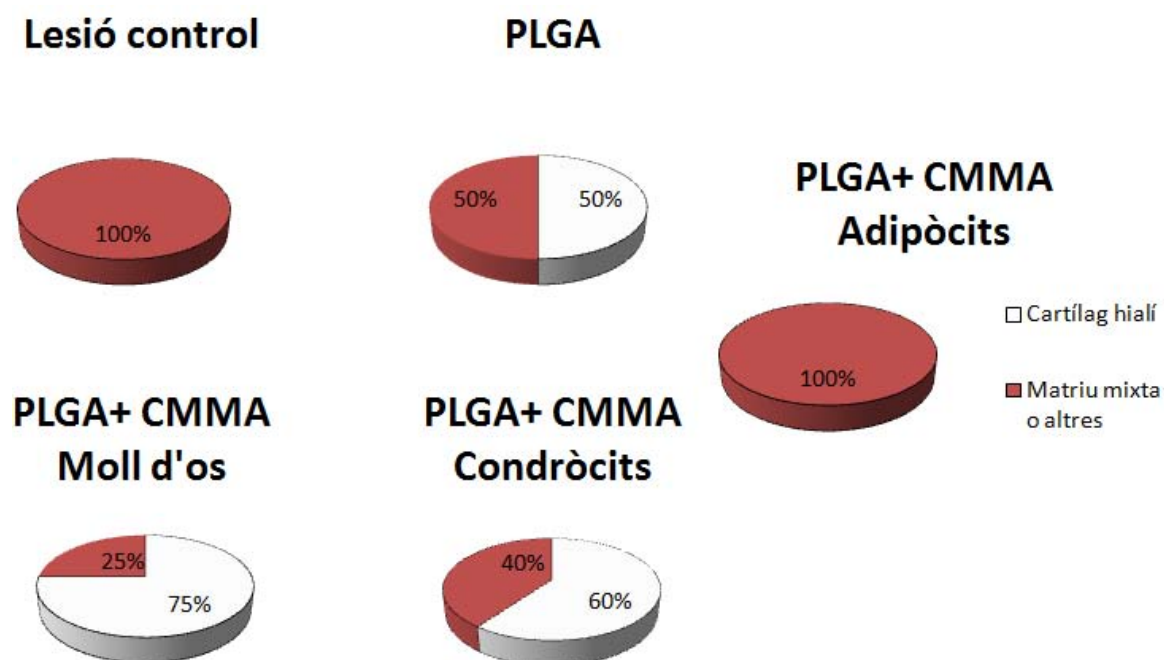


Figura 5.16. Resum dels resultats de la valoració global dels diferents tractaments aplicats als 12 mesos.

De la taula 5.14 i els gràfics de les figures 5.15 i 5.16 es poden extreure diferents conclusions. La primera d'elles és que els subgrups d'estudi que més peces han reparat en forma de cartílag hialí han estat les tractades amb CMMA provinents de moll d'os (3 peces) i de cartílag

articular (3 peces). Anteriorment ja s'han comentat estudis que afirmen que el tractament de defectes osteocondrals amb CMMA provinents de moll d'os o cartílag articular amb empelts de periosti que recobreixen la solució cel·lular que s'implanta en la lesió, milloren la condició del pacient però no s'aprecien diferències significatives entre les dues alternatives de font cel·lular (Nejadnik et al. 2010). En aquest cas, malgrat que s'ha incorporat una matriu de PLGA condroinductora, biocompatible i reabsorbible, no s'observen grans diferències entre les dues fonts cel·lulars, moll d'os i cartílag articular. En canvi si que s'observen diferències amb el tractament amb CMMA provinents de teixit adipós, on ja s'ha comentat anteriorment la diferència en les valoracions histològiques i macroscòpiques i a més a més, només una de les peces d'aquest subgrup ha generat cartílag hialí. Si es parteix de la base que les CMMA provinents de moll d'os són el l'estàndard cel·lular per a la regeneració de diferents teixits, en aquest estudi s'ha demostrat que les altres fonts de CMMA, teixit adipós i cartílag hialí no milloren els resultats de regeneració de cartílag hialí en defectes osteocondrals ovins a llarg termini. Així doncs, es proposa la utilització de les CMMA provinents de moll d'os amb una biomatriu, PLGA, que ha demostrat ser segura, biocompatible, reabsorbible, amb una osteointegració correcta i unes capacitats condroinductives que han portat a la regeneració de cartílag hialí en alguns dels animals en que s'ha investigat el seu efecte regenerador.

No s'observen diferències entre les diferents dosis utilitzades en aquest estudi. Malgrat que el millor resultat s'ha obtingut amb una matriu de PLGA colonitzada a alta densitat per CMMA provinent de moll d'os, no es pot determinar amb els resultats dels que es disposa sobre la dosi que genera un cartílag de millor qualitat. És a dir, si les dosis utilitzades presenten resultats similars, l'estratègia per la que s'optaria en un possible assaig clínic seria la densitat més baixa ja que així es necessitarien menys cèl·lules a expandir, reduint així els costos de producció, qualsevol risc potencial degut a les cèl·lules, i els dies d'espera entre l'extracció del teixit i la reintroducció de les cèl·lules expandides.

L'estratègia autòloga d'aquest tractament presenta certes característiques que dificulten una estandardització i homogeneïtzació de la teràpia. Al capítol 4 i 5 s'ha comprovat que les cèl·lules de cada animal presentaven una velocitat de creixement diferent. Aquestes diferències que s'observen poden ser degudes al suplement del medi utilitzat (Abukawa et al. 2007) o a les característiques intrínseques de la cèl·lula que s'intenta expandir, malgrat d'haver utilitzat el mateix

medi de cultiu per a totes les expansions i la mateixa estratègia de cultiu. Les característiques cel·lulars es mantenen constants com a mínim fins a 12 duplicacions sense perdre la multipotencialitat (Siddappa et al. 2007), però la velocitat de creixement de cadascuna d'elles és diferent per a cada individu. L'efecte de l'entorn és evident en l'animal F44 on a la mateixa articulació s'ha implantat el mateix tractament sense cèl·lules, PLGA sol, presentant resultats totalment diferents, en un es forma cartílag hialí i a l'altre una matriu mixta entre fibrocartílag i cartílag hialí. En aquest cas és possible que la posició anatòmica, ja sigui lateral o medial influeixi en la regeneració del cartílag hialí degut a l'estimulació biomecànica diferent en cada còndil (Ghosh et al. 1990).

En aquest estudi s'ha utilitzat la RMN com una alternativa més a l'avaluació de la regeneració de cartílag articular. Malgrat es va disposar d'un aparell amb una potència de només 0.2 Tesla, la gran majoria dels anàlisis realitzats presenten una correlació important amb l'anàlisi histològic. S'han pogut quantificar volums de cartílag, identificar zones escleròtiques al voltant de la lesió, edemes relacionats amb la reabsorció de la matriu i la lesió generada artificialment. No s'ha observat cap vessament articular en els tractaments aplicats, l'edema ossi que s'observava a l'experiment pilot ja no s'observa amb els temps d'anàlisi de 6 i 12 mesos, corroborant la idea d'una reabsorció de la matriu que genera aquest edema entre les primeres 2-20 setmanes, el temps que tarda en reabsorbir-se la matriu de PLGA. En qualsevol estudi futur que es pugui realitzar en humans, es necessitarà d'una eina de diagnòstic no invasiva per substituir una d'invasiva com és la biòpsia. Durant l'assaig preclínic s'han realitzat anàlisis de raigs-X a les articulacions, sense presentar cap troballa significativa, patològica o indicativa de lesió/regeneració de cartílag, a diferència de la RMN que ofereix una capacitat de resolució funcional en teixits tous, com el cartílag, molt superior als raigs-X o l'ecografia convencional. Existeixen taules d'avaluació per a les imatges de RMN que s'han utilitzat per avaluar l'evolució a llarg termini (5 anys) de la regeneració de cartílag hialí mitjançant un TACAM (Ebert et al. 2011), però requereixen d'una gran experiència per a la seva aplicació i interpretació. La RMN junt a l'artroscòpia diagnòstica són les tècniques de seguiment que recomana la ICRS per al disseny d'estudis i assaigs preclínics per a la regeneració de cartílag (Mithoefer et al. 2011).

L'estudi realitzat durant aquest treball de tesi presenta certes limitacions, entre elles, el mateix estudi de RMN. El fet de realitzar l'estudi d'imatge amb una resolució de 0.2 Tesla ha limitat

molt la resolució de les imatges i la seva interpretació. La resolució recomanada per aquests estudis és d'un mínim d'1.5 Tesla (Trattinig et al. 2011), però difícilment es poden trobar aparells d'aquesta resolució per a investigació animal en el nostre territori. Una altra de les limitacions que presenta l'estudi és la falta de coneixement sobre les CMMA, ja que són unes cèl·lules que no tenen un marcador característic, malgrat existeixen criteris per definir-les, no es poden aïllar mitjançant un mètode que asseguri que el 100% de la població correspon a les CMMA. Aquest fet provoca una baixada en el rendiment d'expansió de les CMMA, ja que una vegada s'ha expandit tot el material cel·lular aïllat, no és possible saber quina proporció de la població cel·lular que s'utilitza per a la teràpia correspon a CMMA. Cal una caracterització més extensa de les CMMA a nivell molecular i fisiològic, ampliar el nombre de marcadors de superfície i realitzar assajos de tumorigenicitat en ratolins per refermar la bioseguretat d'aquestes cèl·lules.

Una altra limitació és el nombre d'animals que s'utilitza durant l'estudi. Al treballar amb una espècie com l'ovella es limita la quantitat d'animals amb el que es pot treballar, en comparació amb altres animals més petits i més econòmics com el conill o el ratolí. Això condiona l'experiment, per exemple, amb la utilització dels dos còndils de l'articulació per tal d'augmentar les variables a experimentar sense haver de duplicar o triplicar el nombre d'animals, introduint una limitació més com és el fet de provar els tractaments en els dos còndils de l'articulació al mateix temps, podent-hi haver afectat la seva càrrega diferencial, per això calen estudis de biomecànica sobre la distribució de les càrregues abans i després de l'aplicació del tractament. Per altra banda, les CMMA que s'utilitzen s'haurien de marcar amb algun compost, ja sigui una nanopartícula que pugui ser localitzada posteriorment amb una RMN (Jing et al. 2008) o un marcador fluorescent com el BrdU (Carstanjen et al. 2006) que permetés localitzar-les *in vivo* per demostrar que no migren cap a altres compartiments de l'articulació o fora d'aquesta. Existeixen estudis que demostren que les cèl·lules poden migrar cap a la sinòvia o l'os subcondral, però també apunten que les cèl·lules que s'adhereixen a lesió, no migren cap al cartílag adjacent (Jing et al. 2008). En aquest estudi, el fet d'haver analitzat els ganglis proximals a l'articulació, i comprovar que no mostraven signes d'inflamació pot ser una mesura indirecta de l'absència de migració d'aquestes cèl·lules cap a altres parts del cos.

En futurs estudis s'haurien de superar aquestes limitacions esmentades anteriorment, i realitzar estudis més complets, tenint en compte les limitacions esmentades anteriorment, per

poder traspasar aquesta teràpia cap a aplicacions clíniques per poder-se sumar a les teràpies ja existents. La medicina regenerativa repara o regenera cèl·lules humanes, teixits, òrgans, per tant, és una oportunitat per a l'abordatge d'una ventall de malalties molt extens. L'establiment d'un quart pilar en la sanitat, un sector basat en terapèutica cel·lular, que ha de determinar clarament els seus objectius i les seves possibilitats a curt i llarg termini. És important la divulgació de la recerca que s'està fent en aquest camp i l'establiment de ponts entre la recerca bàsica i el desenvolupament de productes de medicina regenerativa amb una visió de conjunt que englobi tot el procés per no repetir errors comesos en el desenvolupament d'altres tecnologies sanitàries en el passat (Mason et al. 2006).

Les expectatives econòmiques i socials són grans per fer front a aquest tipus de noves teràpies, per aquest motiu s'ha portat a terme, en la majoria d'aquest treball, de la forma més aproximada a la normativa que exigeix el compliment de Bones Pràctiques de Laboratori per a la realització d'assaigs preclínic que puguin ser validats per ser admesos com a evidència científica per demanar les autoritzacions pertinents a les autoritats per a iniciar un assaig clínic en humans. En definitiva, en aquest treball s'han posat a punt les bases i la tecnologia necessària per a la generació de tractaments basats en la medicina regenerativa, utilitzant CMMA de diversos orígens combinats amb una biomatriu de PLGA per a la regeneració de defectes osteocondrals. L'estratègia que es recomana es resumeix en una teràpia basada en una matriu de PLGA colonitzada per CMMA provinents de moll d'os, a una densitat al voltant de $1,5 \cdot 10^7$ CMMA/cm³ de biomatriu. Les cèl·lules s'aïllen mitjançant un mètode basat en la centrifugació per gradient del moll d'os per obtenir la fracció mononuclear i llavors mitjançant el cultiu en flascons de cultiu o una superfície adherent que permeti la població de cèl·lules adherent d'aquesta fracció mononuclear créixer, donant lloc a una població homogènia de CMMA. Les CMMA s'expandeixen durant el temps requerit per obtenir la quantitat necessària de cèl·lules per poder colonitzar la biomatriu amb la densitat establerta mitjançant un minibioreactor durant 24 hores. Finalment s'implanta el constructe a la lesió osteocondral mitjançant una artroscòpia. El procés ha quedat definit, però tal i com s'ha comentat durant el treball, s'han d'acomplir un requisits de fabricació i normes de qualitat GMP d'acord amb la legislació vigent de cada país on es vulgui explotar la teràpia comercialment.

5.3. Bibliografia

- (2007). Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. L 324/121. T. E. P. a. t. C. o. t. E. Union. Official Journal of the European Union.
- Abukawa, H., et al. (2007). "Effects on Porcine Mesenchymal Stem Cells When Cultured in Autologous Versus Fetal Bovine Serum." Journal of Oral Tissue Engineering **5**(1): 23-34.
- Ahern, B. J., et al. (2009). "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review." Osteoarthritis and Cartilage **17**(6): 705-713.
- Andereya, S., et al. (2006). "First clinical experiences with a novel 3D-collagen gel (CaReS) for the treatment of focal cartilage defects in the knee]." Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete **144**(3): 272.
- Bartlett, W., et al. (2005). "Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study." Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume **87**(5): 640.
- Bartolo, P. J. S., et al. (2009). "Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds." International Journal of Computer Applications in Technology **36**(1): 1-9.
- Basad, E., et al. (2010). "Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study." Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy **18**(4): 519-527.
- Benito, M. J., et al. (2005). "Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis." Annals of the rheumatic diseases **64**(9): 1263.
- Carstanjen, B., et al. (2006). "Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse." Canadian journal of veterinary research **70**(2): 143.
- Casteilla, L., et al. "Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update."
- Centeno, C. J., et al. (2011). "The Use of Mesenchymal Stem Cells in Orthopedics: Review of the Literature, Current Research, and Regulatory Landscape." Journal of American Physicians and Surgeons **16**(2): 38.
- Centeno, C. J., et al. (2010). "Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique." Current Stem Cell Research & Therapy **5**(1): 81-93.
- Chiang, H., et al. (2010). "Comparison of Articular Cartilage Repair by Autologous Chondrocytes With and Without In Vitro Cultivation." Tissue Engineering Part C: Methods **16**(2): 291-300.
- Dedrick, V. A. (1997). "Determining the safety of medical devices containing animal tissue: the new European standards." J Regul Affairs Prof Soc **4**: 2-20.
- Ebert, J. R., et al. (2011). "Clinical and Magnetic Resonance Imaging-Based Outcomes to 5 Years After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation to Address Articular Cartilage Defects in the Knee." The American Journal of Sports Medicine **39**(4): 753.
- EMA (2007). Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products. EMA/CHMP/410869/2006. E. M. Agency. London: 18-20.
- Erggelet, C., et al. (2008). Principles of Cartilage Repair, Steinkopff.
- Erggelet, C., et al. (2007). "Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants." Biomaterials **28**(36): 5570-5580.
- Erggelet, C., et al. (2003). "The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint." Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery **19**(1): 108-110.
- Ghosh, P., et al. (1990). "The influence of weight-bearing exercise on articular cartilage of meniscectomized joints: an experimental study in sheep." Clinical orthopaedics and related research **252**: 101.
- González, M. A., et al. (2009). "Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose derived mesenchymal stem cells." Arthritis & Rheumatism **60**(4): 1006-1019.
- Guo, X., et al. (2004). "Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep." Tissue Engineering **10**(11-12): 1830-1840.

- Han, S. H., et al. (2008). "Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo." J Biomed Mater Res A **87**(4): 850-861.
- Harrison, P. E., et al. (2003). "Serum from patients anesthetized with opiates less effective in the support of chondrocyte growth in vitro." Tissue Engineering **9**(1): 37-39.
- Hentze, H., et al. (2007). "Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts." Trends in Biotechnology **25**(1): 24-32.
- Hoemann, C., et al. (2011). "International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials." Cartilage **2**(2): 153.
- Hollister, S. J. (2009). "Scaffold engineering: a bridge to where?" Biofabrication **1**: 012001.
- Im, G. I., et al. (2001). "Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow." Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume **83**(2): 289.
- Im, G. I. I., et al. (2005). "Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?" Osteoarthritis and Cartilage **13**(10): 845-853.
- Jackson, D. W., et al. (2001). "Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model: a preliminary study." The Journal of Bone and Joint Surgery **83**(1): 53.
- Jeffrey, M. "Phases I&# 8211; III Clinical Trials Using Adult Stem Cells." Stem Cells International **2010**.
- Jiang, C. C., et al. (2007). "Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite." Journal of Orthopaedic Research **25**(10): 1277-1290.
- Jing, X., et al. (2008). "In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection." Joint Bone Spine **75**(4): 432-438.
- Johnson, P. C., et al. (2007). "Strategic directions in tissue engineering." Tissue Engineering **13**(12): 2827-2837.
- Koga, H., et al. (2007). "Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration." Stem cells **25**(3): 689-696.
- Kon, E., et al. (2009). "Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee." The American Journal of Sports Medicine **37**(1): 33.
- Kreuz, P. C., et al. (2011). "Repair of Focal Cartilage Defects With Scaffold-Assisted Autologous Chondrocyte Grafts: Clinical and Biomechanical Results 48 Months After Transplantation." The American Journal of Sports Medicine.
- Lazarus, H. M., et al. (1995). "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use." Bone marrow transplantation **16**(4): 557-564.
- Lee, M. H., et al. (2009). "Considerations for tissue-engineered and regenerative medicine product development prior to clinical trials in the United States." Tissue Engineering Part B: Reviews **16**(1): 41-54.
- Lysaght, M. J., et al. (2008). "Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics." Tissue Engineering Part A **14**(2): 305-315.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2003). "Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 45.
- Mason, C., et al. (2006). "Regenerative medicine bioprocessing: the need to learn from the experience of other fields." Regenerative medicine **1**(5): 615.
- Mason, C., et al. (2010). "Regenerative medicine cell therapies: numbers of units manufactured and patients treated between 1988 and 2010." Regen. Med **5**(3): 307-313.
- Merceron, C., et al. (2008). "Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering." Joint, bone, spine: revue du rhumatisme **75**(6): 672.
- Mesimäki, K., et al. (2009). "Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells." International journal of oral and maxillofacial surgery **38**(3): 201-209.
- Milne, E., et al. (2006). "Cost effective biochemistry and haematology in sheep." In Practice **28**(8): 454.
- Mithoefer, K., et al. (2011). "Guidelines for the Design and Conduct of Clinical Studies in Knee Articular Cartilage Repair." Cartilage **2**(2): 100.

- Murphy, J., et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." Arthritis & Rheumatism **48**(12): 3464-3474.
- Murphy, J. M., et al. (2003). "Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis." Arthritis & Rheumatism **48**(12): 3464-3474.
- Nagura, I., et al. (2007). "Repair of osteochondral defects with a new porous synthetic polymer scaffold." The Journal of bone and joint surgery. British volume **89**(2): 258.
- Nehrer, S., et al. (2008). "Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study." Clinical Orthopaedics and Related Research® **466**(8): 1849-1855.
- Nejadnik, H., et al. (2010). "Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation." The American Journal of Sports Medicine **38**(6): 1110.
- Ng, F., et al. (2008). "PDGF, TGF- β ², and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages." Blood **112**(2): 295-307.
- Patrascu, J. M., et al. (2010). "Repair of a post-traumatic cartilage defect with a cell-free polymer-based cartilage implant." J Bone Joint Surg [Br] **2010**(92-B): 1160-3.
- Rada, T., et al. (2009). "Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering." Tissue Engineering Part B: Reviews **15**(2): 113-125.
- Rayment, E. A., et al. (2010). "Concise Review: Mind the Gap: Challenges in Characterizing and Quantifying Cell and Tissue Based Therapies for Clinical Translation." Stem cells **28**(5): 996-1004.
- Russell, K. E., et al. (2007). "Evaluation of the ruminant serum chemistry profile." Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice **23**(3): 403-426.
- Siddappa, R., et al. (2007). "Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering." Journal of Orthopaedic Research **25**(8): 1029-1041.
- Simon, T. M., et al. (2009). "Cartilage Regeneration and Repair Testing in a Surrogate Large Animal Model." Tissue Engineering Part B: Reviews **16**(1): 65-79.
- Solchaga, L. A., et al. (2005). "Repair of osteochondral defects with hyaluronan-and polyester-based scaffolds." Osteoarthritis and Cartilage **13**(4): 297-309.
- Stute, N., et al. (2004). "Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use." Exp Hematol **32**(12): 1212-25.
- Trattinig, S., et al. (2011). "Magnetic Resonance Imaging of Cartilage Repair." Cartilage **2**(1): 5.
- van den Borne, M. P. J., et al. (2007). "International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture1." Osteoarthritis and Cartilage **15**(12): 1397-1402.
- Wei, X., et al. (1997). "Maturation dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint." Journal of biomedical materials research **34**(1): 63-72.
- Zscharnack, M., et al. (2010). "Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model." The American Journal of Sports Medicine **38**(9): 1857.

CAPÍTOL 6

CONCLUSIONS

6.1. Conclusions finals del treball.

Els problemes de salut derivats de les malalties articulars i patologies del cartílag hialí són una càrrega econòmica i social important. Les característiques del cartílag hialí fan que sigui un teixit que no tingui capacitat de regeneració. Els tractaments actuals no són satisfactoris, ja que en la gran majoria generen un teixit fibrós que no acaba de tenir les mateixes característiques mecàniques i estructurals que el cartílag hialí. Per això, en aquest treball de tesi s'ha plantejat un nou tractament per a la regeneració de les lesions osteocondrals. L'estudi de les cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA) i el biopolímer de PLGA ha permès dissenyar i avaluar el tractament proposat en un assaig preclínic amb el model oví.

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball s'han pogut extreure les següents conclusions finals:

- S'ha aconseguit aïllar CMMA de cartílag hialí, moll d'os i greix de l'espècie ovina. Fins al moment no s'havien descrit CMMA provinents de greix en aquest model animal. Els

rendiments d'obtenció de CMMA són específics de cada animal i no s'ha trobat cap relació que pugui servir per predir la qualitat del teixit en la extracció.

- S'ha demostrat que les cèl·lules compleixen els requisits que estableix l'*International Stem Cell Society* per considerar aquestes cèl·lules com a CMMA. Les cèl·lules creixen en adherència amb aspecte fibroblàstic, presenten multipotencialitat cap a diferents llinatges (condrogènic, osteogènic i adipogènic) i mostren un marcatge immunofenotípic correcte. Les CMMA són positives per a CD44 i CD90 i negatives per a CD45 i HLA-DR.

- S'ha aconseguit expandir les CMMA fins a densitats cel·lulars màximes de $1E+05$ CMMA/cm² en el cas oví, i $5E+04$ CMMA/cm² en el cas de les humanes. Addicionalment s'ha observat i constatat una relació inversa entre l'inòcul (densitat de sembra inicial) i la velocitat específica de creixement, quan més baix és l'inòcul, més alta és la velocitat específica de creixement.

- S'ha demostrat que la utilització de sèrum AB o autòleg com a suplement del medi de cultiu és una alternativa vàlida per a l'expansió de CMMA, substituint així el sèrum fetal boví. Malgrat s'han observat problemes en alguns sèrums autòlegs que no serveixen per expandir algun tipus de CMMA en un individu específic, la realització d'un pool sèric, a partir de diferents sèrums autòlegs, ha demostrat la seva efectivitat per ser utilitzat com a suplement del medi en la expansió cel·lular.

- S'ha aconseguit fabricar el biopolímer de PLGA amb una porositat entre 0,3mm i 0,5mm que permet la colonització homogènia d'aquest per part de les CMMA. S'ha calculat el temps de degradació al voltant dels 50-60 dies.

- S'ha desenvolupat un sistema de colonització estèril i fiable que en 24 hores, permet la introducció del 80% de les CMMA que s'intenten colonitzar. El sistema està format per un minibioreactor amb una agulla que manté el biopolímer en la mateixa posició mentre el medi amb les CMMA en suspensió és agitat mitjançant un pèndol magnètic.

- Amb la col·laboració d'especialistes en diversos àmbits, s'ha aconseguit portar a terme l'assaig preclínic, en el que s'extreuen els teixits, s'aïllen les CMMA, s'expandeixen durant 20-22 dies, es colonitzen a dintre de cilindres de PLGA i s'implanten artroscòpicament sobre una lesió osteocondral generada artificialment.

- Malgrat el nombre d'animals tractats i la disparitat de resultats, és evident que el tractament és més eficaç als 12 mesos. Així s'observa un component temporal de millora de la qualitat del cartílag que es deriva del tractament aplicat. El tractament no ha estat eficaç en tots els individus, però sí en alguns, per tant existeix una variabilitat individual de la qualitat de les CMMA autòlogues i de les característiques intrínseques del pacient que determinaran l'eficàcia del tractament.

- El tractament és local, i no presenta cap repercussió a nivell sistèmic al no trobar-se afectació d'altres òrgans a les necròpsies realitzades per especialistes anatomopatòlegs veterinaris. Amb l'excepció d'un dels animals que va morir durant l'experiment, per causes no relacionades amb el tractament, la resta dels animals van presentar un estat de salut correcte. Durant els mesos que va durar l'experiment, els animals no van presentar cap tipus de claudicació, una vegada passats els 10 dies post-operació. Així doncs, queda demostrada la seguretat del tractament. S'ha demostrat que el tractament que s'ha dissenyat i desenvolupat durant aquest treball, és segur als 6 i 12 mesos.

- L'avaluació mitjançant l'observació macroscòpica, microscòpica i per imatges de ressonància magnètica nuclear (RMN), mostra uns resultats dispars entre els diferents tractaments aplicats i entre ells mateixos. Es pot afirmar que el tractament més eficaç als 12 mesos s'ha obtingut amb el constructe PLGA+CMMA provinents de moll d'os, ja que mostra la màxima puntuació histològica i macroscòpica.

- S'ha descartat la tècnica de la RT-PCR per a l'avaluació de les mostres biològiques, ja que malmet les mostres i llavors no es poden analitzar mitjançant talls histològics.

- L'avaluació microscòpica amb histologia és el sistema d'avaluació que permet determinar amb més certesa la regeneració cel·lulars. S'han trobat casos d'una puntuació

macroscòpica alta i un bon aspecte en la imatge de RMN, però amb una imatge histològica que presenta fibrocartílag.

- En general, es pot afirmar que existeix correlació entre la imatge de RMN i els resultats histològic. Llavors, aquest sistema es podria validar per a l'avaluació de la regeneració de cartílag hialí com a mètode d'avaluació no invasiu. Cal remarcar també que en aquest estudi, la qualitat de les imatges de RMN suposen una limitació per la seva baixa resolució (l'aparell disposava de 0,2 Tesla de potència).

- Pel que fa a les limitacions que ha presentat l'estudi, cal una caracterització més extensa de les CMMA a nivell molecular i fisiològic, ampliar el nombre de marcadors de superfície i realitzar assajos de tumorogènicitat en ratolins. El fet de provar els constructes en els dos còndils de l'articulació pot afectar la seva càrrega diferencial, per això calen estudis de biomecànica sobre la distribució de les càrregues abans i després de l'aplicació del tractament. Les CMMA que s'utilitzen s'haurien de marcar amb algun compost que permetés localitzar-les *in vivo* per demostrar que no migren cap a altres compartiments de l'articulació o fora d'aquesta. Com a últim apunt, seria necessari augmentar la potència de la RMN fins a 1,5 Tesla per obtenir unes imatges de millor qualitat i més detallades per poder correlacionar millor els resultats histològics amb les imatges de RMN.

- Tot i les limitacions, es pot afirmar que mitjançant un tractament basat en CMMA de diversos orígens colonitzades a dintre d'una biomatriu de PLGA, aplicat artroscòpicament sobre un lesió artificial, s'ha aconseguit regenerar i reparar una lesió osteocondral i amb la generació d'un teixit histològicament equivalent al cartílag hialí. L'estratègia que es recomana és resumeix en una teràpia basada en una matriu de PLGA colonitzada per CMMA provinents de moll d'os, a una densitat al voltant de $1,5 \cdot 10^7$ CMMA/cm³ de biomatriu.

- L'aplicació d'aquest tipus de tractaments en la clínica humana requerirà d'un estudi més exhaustiu i la fabricació de tots els elements d'acord amb les normes de correcta fabricació (GMP).

CAPÍTOL 7

MATERIALS I MÈTODES

7.1 Línies cel·lulars.

En aquest treball de tesi, s'han aïllat i caracteritzat diverses línies cel·lulars adherents amb característiques diferents per a la regeneració de cartílag articular, cadascuna procedent d'un teixit diferent i espècies diferents. En alguns casos s'han utilitzat protocols establerts a la literatura i en altres s'han dissenyat i desenvolupat nous mètodes per a l'aïllament i l'expansió de les cèl·lules mare mesenquimals adultes. A continuació es presenten el protocols d'aïllament i obtenció de les diverses línies cel·lulars utilitzades.

7.1.1 Cèl·lules mare mesenquimals adultes (CMMA).

En aquest treball les línees cel·lulars provinents de teixits humans s'han utilitzat només per a la seva caracterització cinètica i fisiològica, en canvi, les procedents del model oví s'han estudiat per a les aplicacions proposades, i concretament al capítol 4 i 5 per a la regeneració de lesions osteocondrals mitjançant un constructe biomatriu (PLGA) – cèl·lula. En el cas dels teixits humans, les CMMA de greix i moll d'os varen ser aïllades en laboratoris externs i cedides per a la seva

caracterització. En el cas de les CMMA del model oví i el cartílag humà, l'aïllament es realitza al laboratori del grup d'investigació propi.

Les solucions que s'han utilitzat són les següents:

- Solució de transport: PBS + antibiòtics (estreptomicina 0,167 g/l i penicil·lina 0,075 g/l)
- Solució enzimàtica I: PBS + 0,1% (w/v) de col·lagenasa I de Sigma Aldrich (100 mg /l) + 0,36 mM CaCl₂ (0,04g/l). Es guarda congelada per a que no perdi activitat.
- Solució enzimàtica II: PBS + 0,5% (w/v) de col·lagenasa II de Sigma Aldrich (500 mg /l) + 0,36 mM CaCl₂ (0,04g/l). Es guarda congelada per a que no perdi activitat.
- Solució de lisi d'eritròcits: 160 mM NH₄Cl (8,56 g/l) en *Phosphate buffered saline* (PBS, Invitrogen).

7.1.1.1 Aïllament de CMMA procedents de moll d'os oví.

- Es prepara el DMEM (invitrogen) suplementat amb sèrum 5 dies abans de l'extracció de moll d'os i realitza un test d'esterilitat, consistent en el cultiu d'aquest durant una setmana. Es posen 2 mL del medi suplementat en una placa de pous de 6 mL (Orange Scientific) i es deixa a l'incubador de CO₂ (Forma Scientific, Incubador IR amb filtre HEPA) a 37°C i 5%CO₂ , per tal de poder donar per vàlid el test d'esterilitat.
- L'extracció de moll d'os ha de ser duta a terme amb material heparinitzat i amb extraccions de màxim 1 mL per zona d'aspiració.
- El moll d'os s'ha de dipositar als tubs de centrifuga de 50 mL (Orange Scientific) afegint 1 mL d'ACD-A (Grifols) estèril per cada 7 mL de moll d'os.
- La mostra de moll d'os d'ovella obtinguda es transporta des del lloc d'extracció al laboratori a temperatura ambient. Com a màxim podran passar 6 hores entre la extracció i el inici del processament.
- Es posa tot el volum de moll d'os en un flascó de cultiu de T-75 (TPP) mesurant el volum amb una pipeta.
- Es treu una alíquota de 0,5 mL i es fa un test d'esterilitat amb dilucions seriades com s'indica a continuació. En 4 pous d'una placa de 12 pous es posa 1mL de DMEM + 10% sèrum. S'afegeixen els 0,5 mL a un dels pous i s'homogeneïtza. S'agafen 0,5 mL d'aquest pou i es passa al següent pou. Es repeteix l'operació 2 vegades més.

- Continuant amb l'extracció, s'afegeix el mateix volum de PBS que de moll d'os i s'homogeneïtza bé.
- Es preparen tubs de 15 mL amb 7,5mL d'Histopaque 1,077 g/L (Invitrogen).
- A cada tub s'afegeixen 7,5 mL de moll d'os amb PBS lentament i evitant que es barregi amb l'Histopaque. Aquesta operació és molt delicada, ja que és molt important que no es trenqui la interfase que es forma un cop es diposita el moll d'os sobre l'Histopaque. Si es trenca aquesta interfase, la separació per gradient de densitat no resultarà efectiva.
- Es centrifuga amb les condicions següents: 1000G; 35 minuts; 22°C; Acceleració 5; Fre 0.

Un cop fora de la centrífuga (5810R, Eppendorf) l'aspecte ha de ser com el de la figura 7.1.

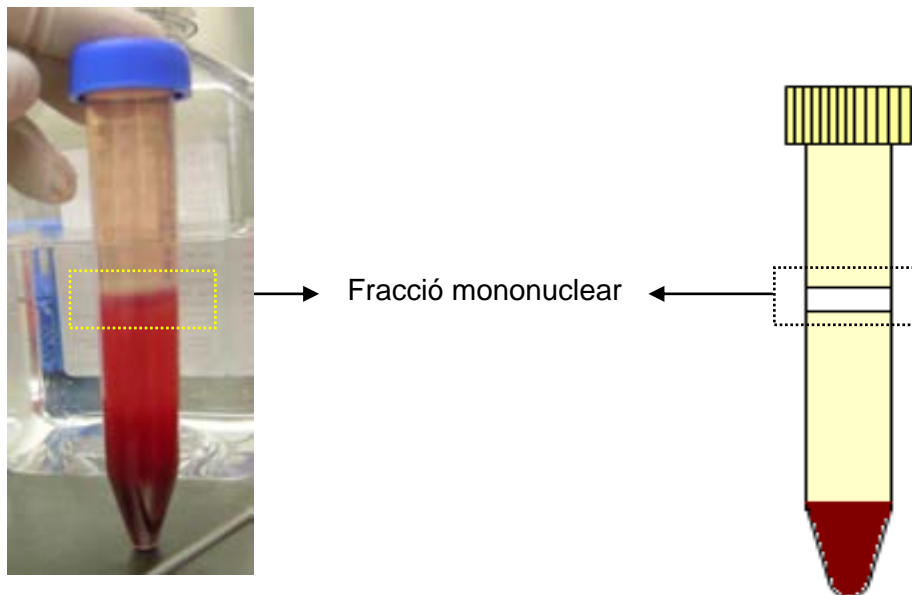


Figura 6.1. Representació esquematitzada esquematitzada i real de la zona d'on s'aislla la fracció mononuclear.

- Es retira la fracció mononuclear amb una pipeta pasteur estèril de plàstic evitant agafar eritròcits i es diposita repartit a parts iguals en 2 tub de 50 mL.
- S'afegeix a cada tub de 50 mL el mateixos mL de PBS com de fracció mononuclear recollida
- Es centrifuga a 400 g 10 minuts.
- Es treu el sobrenedant, es resuspen el botó i s'afegeix 1 mL de solució de lisi d'eritròcits a cada tub de 50mL.

- Es deixa actuar durant 10 minuts.
- S'afegeixen 10 mL de PBS a cada tub de 50 mL.
- Es centrifuga a 400 g 5 minuts.
- Es treu el sobrenedant, es resuspen el botó i s'afegeixen 10 mL de PBS a cada tub de 50 mL.
- Es centrifuga a 400 g 5 minuts.
- Es treu el sobrenedant i s'afegeixen 10 mL de DMEM suplementat al 10% amb sèrum i es recull el contingut dels 2 tubs de 50 mL en un de 50 mL.
- Es treu una alíquota per realitzar un recompte cel·lular.
- Es fa un recompte cel·lular.
- S'utilitzen les següents equacions per calcular les cèl·lules totals i el nombre de CMN per mL de moll d'os:

Cèl·lules totals (CT) = CC · volum total de la suspensió cel·lular (cèl·lules)

Equació 7.1

$$\text{Concentració CMN}(C_{\text{CMN}}) = \frac{\text{CT}}{V_{\text{moll d'os}}} \quad (\text{CMN/mlmoll d'os})$$

- Es calcula el volum de suspensió cel·lular necessari per sembrar un flascó de 150 cm² T-150 (TPP) a 2E+05 cèl·lules/cm²:

$$\text{Volum per sembrar T-150 } (V_{\text{T-150}}) = \frac{4E+05 \text{ cells/cm}^2 \cdot 150\text{cm}^2}{\text{CC}} \quad (\text{ml}) \quad \text{Equació 7.2.}$$

- Es sembren dos flascons de 150cm² T-150 amb el volum V_{T-150} més el volum de DMEM suplementat al 10% amb sèrum corresponent per tenir un volum de cultiu final de 23,6 mL.
- Es guarden a l'incubador de CO₂ a 37°C i 5%CO₂.
- Tres dies després es treu el medi dels flascons, es guarda una alíquota per mesurar glucosa i lactat amb YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments).
- Es fan 2 rentats amb 11,8mL de PBS.
- S'afegeixen 20 mL de DMEM suplementat al 10% amb sèrum pool.
- Es guarden a l'incubador CO₂ a 37°C i 5%CO₂.

- Els cultius s'han d'observar cada dia en el microscopi invertit de contrast fases (Nikon, TMS).
- Cada 72-96h després d'haver rentat les mononuclears, es fa un recanvi de medi. Es treuen els flascons del incubador, i a la campana de flux laminar és descarta el medi i es renova amb 23,6 mL de DMEM suplementat al 10% amb sèrum fresc. Es guarda una alíquota per mesurar glucosa i lactat amb l'analitzador enzimàtic de glucosa/lactat de la companyia Yellow Spring Instruments (YSI, 2700 Select).
- Aproximadament entre els dies 8-10 els cultius arriben a una confluència dels 80-90%, llavors s'ha de realitzar, si escau, el subcultiu.

7.1.1.2 Aïllament de CMMA procedents de cartílag articular oví o humà.

Les mostres de cartílag humà i oví han estat proporcionades per la Clínica ASEPEYO i el departament de cirurgia animal de la facultat de veterinària respectivament. En ambdós casos es disposava de previ consentiment informat dels pacients humans i del permís de la Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) de la UAB en el cas oví (número 688). L'obtenció del teixit i aïllament de les CMMA es realitza sempre seguint el següent protocol:

- L'obtenció de cartílag pot ser via artroscòpica (humà, oví) i, artrotomia (oví) o d'una pròtesis de maluc (humà).
- En el cas humà, es pot realitzar artroscòpicament o des d'una pròtesis de maluc i en ambdós casos s'extrau una petita biòpsia de la zona blanquinosa on es troba el cartílag hialí.
- En el cas oví, es pot sacrificar l'ovella i realitzar una artrotomia simple i extreure petits fragments de cartílag hialí, o practicar una artroscòpia, posada a punt durant el projecte, per danyar mínimament durant la cirurgia a l'animal.
- Un cop el cirurgià extreu el cartílag, es traspasa a un tub estèril de 50 mL (Orange Scientific) amb 10 mL de solució de transport. El cartílag es processa ràpidament per obtenir fragments petits que es tallen amb un bisturí per facilitar la posterior disgregació enzimàtica.
- Es col·loquen els teixits fragmentats individualment en pous de placa de 6 (Orange Scientific) i s'afegeix la solució enzimàtica II en un volum final de 0,2 mL. Es deixa incubant a 37°C tota la nit en el incubador de CO₂.

- Durant els següents dos dies es fan observacions al microscopi dels fragments de cartílag en procés de disgregació cel·lular. Es pot afegir 0,2 mL de Col·lagenasa tipus II (0,5mg/mL, Sigma Aldrich) si es considera que els macroagregats cel·lulars són encara nombrosos i voluminosos.
- Un cop el procés de disgregació ha finalitzat s'afegeixen 2 mL de DMEM a cada pou i s'ajuda a disgregar amb la pipeta, traspasant tot el material a un tub de centrifuga de 15 mL (Orange Scientific).
- A continuació es centrifuga a 1800 rpm durant 10min. Es retira el sobrenedant.
- Es resuspenen les cèl·lules amb 5mL de DMEM +10% sèrum i es passa a un T-25, afegint 3 mL més de DMEM+10% sèrum. Es deixa cultivant a 37°C a l'incubador de CO₂.
- Amb una alíquota de la suspensió cel·lular anterior es fa un recompte cel·lular i es determina la concentració, la viabilitat i el rendiment d'obtenció de CMA.
- S'incuben a l'incubador de CO₂ a 37°C i 5%CO₂
- Els cultius s'han d'observar cada dia en el microscopi invertit de contrast de fase.
- En el moment que s'observa la majoria de cèl·lules amb morfologia mesenquimal (fibroblàstica) i adherents, aproximadament als 5-6 dies es fa un recanvi de medi. Es treuen els flascons del incubador de CO₂, i a la cabina de flux laminar és descarta el medi i es renova amb 10 mL de DMEM suplementat al 10% amb sèrum fresc. Es guarda una alíquota per mesurar glucosa i lactat amb l'YSI (2700 Select).
- Aproximadament entre els dies 8-10 els cultius arriben a una confluència dels 80-90%. És el moment de fer el subcultiu.

7.1.1.3 Aïllament de CMMA procedents de teixit adipós ovi.

- Cal al·lotjar 15 mL de solució de transport en tubs falcon de 50 mL i pesar cadascun dels tubs falcons (per poder saber després el pes de teixit adipós obtingut).
- Es treuen mostres de teixit adipós de la zona propera a la cresta ilíaca.
- Un cop al laboratori es pesa cadascun dels tubs falcons i s'anota el pes.
- Es treu el falcon de la solució enzimàtica i del congelador i es deixa a l'incubador de CO₂ per a que assoleixi la temperatura de 37°C.

- El teixit es renta amb PBS 2 – 3 vegades per eliminar les restes de sang.
- Es disgrega el teixit mecànicament mitjançant tisores estèrils i bisturí estèril i una superfície estèril (tapa d'una placa de 6 pous).
- Es reparteix el teixit en tubs falcons (aproximadament 10 mL a cadascun).
- S'afegeixen 10 mL de la solució enzimàtica a 37°C (igual de volum que de teixit).
- Es deixa actuar l'enzim durant 2 hores amb agitació (Placa d'agitació a 37°C), sinó a l'incubador (a 37°C) i barrejant manualment cada 15 minuts.
- Afegir 20 mL de PBS i centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts.
- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pelet en 10 mL de PBS
- Tornar a centrifugar 1500 rpm durant 5 minuts
- Eliminar el sobrenedant.
- Afegir 1 mL de la solució de lisi d'eritròcits i deixar actuar durant 10 minuts màxim a temperatura ambient.
- Centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts i eliminar el sobrenedant
- Resuspendre el pelet en 5 mL de DMEM + 10% sèrum autòleg i fer passar per un filtre estèril de nylon de 100 µm (BD Biosciences). Si cal, fer passar DMEM + 10% sèrum autòleg pel falcon antic i pel filtre per recuperar el màxim de cèl·lules possible.
- Treure una alíquota de 200 µL i realitzar un recompte de cèl·lules.
- Sembrar a 5E+03 cèl·lules/cm² en flascons amb medi DMEM + 10% sèrum autòleg i deixar a l'incubador de CO₂ a 37°C i 5%CO₂.
- Passades 24 hores observar al microscopi invertit de contrast de fase i si hi ha cèl·lules enganxades fer un recanvi de medi amb DMEM + 10% sèrum autòleg amb per eliminar les cèl·lules no adherides, sinó esperar fins a les 72 hores.

7.2 Manteniment de les línies cel·lulars.

Al treballar només amb línies cel·lulars animals adherents, els protocols de manteniment seran els mateixos per a les diferents línies cel·lulars emprades al llarg d'aquest treball. Aquestes línies cel·lulars es conserven en criotubs congelats en nitrogen líquid a la temperatura de -196°C.

En el moment en que s'ha d'iniciar un experiment es descongela un dels criotubs i s'inicia un cultiu en suspensió de les cèl·lules.

Si es desitja preservar alguna de les línies obtingudes durant el treball es procedeix a la seva congelació i conservació en nitrogen líquid. El manteniment de l'esterilitat en tots aquests processos és d'extrema importància, per aquest motiu cal comprovar regularment l'absència de contaminacions.

7.2.1 Congelació.

En el procediment per a congelar les línies cel·lulars s'utilitzen els mateixos medis i sèrums que s'utilitzen per als subcultius de les cèl·lules corresponents. Per la preparació de cada criotub de cèl·lules congelades els passos a seguir són els que es mostren a continuació. Cal tenir en compte però, que abans de procedir a la congelació de la línia cel·lular és important que les cèl·lules estiguin dins la fase exponencial de creixement i que la viabilitat del cultiu sigui alta (>90%). El procés de congelació consta dels següents passos:

- Es fan créixer les cèl·lules a l'interior d'un flascó de cultiu de 75 o 150 cm² segons la línia cel·lular a congelar, fins que la densitat cel·lular aconseguida sigui suficientment elevada. Observar les cèl·lules a congelar al microscopi parant atenció a la morfologia cel·lular, la densitat cel·lular (no ha d'excedir el 90% de la confluència) i contaminacions microbianes (utilitzant com a mínim els objectius de 10x i 20x). Descartar aquells cultius dels quals es tingui alguna sospita que no compleixin els requisits anteriors.

- Es preparen els medis de congelació:

MEDI I: Medi DMEM amb 10% (v/v) de sèrum . Es manté a temperatura ambient.

MEDI II: Medi DMEM amb 20% de sèrum (v/v) i 10% (v/v) de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma Aldrich). Es manté a temperatura ambient.

- Tripsinitzar i inactivar la tripsina amb el medi de creixement.
- Treure una alíquota per comptar.
- Comptar les cèl·lules viables i les totals a la cambra de Neubauer fent una dilució 1:1 amb blau de tripà. Estimar el nombre de cèl·lules totals i la viabilitat cel·lular.

Els cultius en bon estat han de superar el 90% de viabilitat. Viabilitats més baixes o la presència de grans quantitats de restes cel·lular són indicadors de condicions de cultiu subòptimes o exhauriment dels nutrients. Aquests cultius no s'han de congelar.

- Cada criotub (Nunc) ha de contenir $1E+06$ cèl·lules en 1 mL de medi de congelació. Calcular el volum de cèl·lules necessari per a cada criotub i posar totes les cèl·lules de tots els criotubs en un tub de centrifuga
- Centrifugar a 1500 rpm 5 minuts .
- Treure el medi de cultiu i resuspendre el pèl·let i afegir medi de congelació II (1,5 mL per cada criotub).
- Transferir les cèl·lules en criotubs prèviament identificats amb la següent informació:
 - Tipus cel·lular
 - Nombre de ressembres
 - Medi i sèrum amb els quals es cultiva la línia cel·lular
 - Data de congelació
 - Persona que ha congelat
- Es dipositen els tubs al Mr Frosty (Nalgene) omplert amb isopropanol i es posa el Mr Frosty al congelador de -80°C durant 24h.
- Passades les 24h els criotubs es guarden al nitrogen líquid i s'omple el registre del tanc de nitrogen líquid.
- Verificar la viabilitat cel·lular, el nombre de cèl·lules i el creixement cel·lular de com a mínim un dels criotubs, a partir de 24h després d'haver-los traspasat al nitrogen líquid (veure el protocol de descongelació). Cal omplir en el registre la viabilitat cel·lular i el nombre de cèl·lules del vial descongelat.

7.2.2 Descongelació.

La descongelació ha de ser un procés ràpid per tal d'assegurar una recuperació òptima de la cèl·lula. El procés de descongelació consta dels següents passos:

- Es prepara la solució de descongelació:

Medi DMEM amb 20% (v/v) de sèrum autòleg o "pool".

- S'agafa un criotub del congelador de nitrogen líquid i es posa a l'incubador de CO₂ a 37°C. És important que la suspensió cel·lular no es deixi més temps del necessari per a descongelar-se ja que el medi de congelació porta DMSO, que és tòxic per a les cèl·lules.
- Quan s'ha desfet l'últim tros de gel (5 minuts aproximadament) transferir el contingut de cadascun dels criotubs en un tub de centrifuga de 15 mL.
- Diluir 1:1 amb solució de descongelació. Addicionar la solució de descongelació de la següent manera:
 - 0,25 mL → 2 min a 4 °C
 - 0,25 mL → 2 min a 4 °C
 - 0,5 mL → 2 min a 4 °C
- Afegir 10 mL del medi de cultiu amb un 10% de sèrum i treure una alíquota de 0,2 mL per al recompte
- Comptar i calcular les cèl·lules viables i la viabilitat cel·lular.
- Calcular el volum necessari per a sembrar nous cultius a un 40% de la confluència.
- Fer un recanvi de medi a les 24h per eliminar el DMSO restant.

7.2.3 Manteniment de les línees cel·lulars en cultiu.

Una vegada es disposa de la línia cel·lular descongelada, les cèl·lules es cultiven en flascons de 25 a 300 cm². En el cas de cultiu de cèl·lules mesenquimals de moll d'os no s'aconsella la utilització de flascons de 25 cm², ja que la superfície d'adhesió és massa petita. L'inòcul utilitzat és de 1·6E+05 cèl·lules vives/cm² per a les cèl·lules mononuclears d'ovella provinents de moll d'os i de 1·4E+03 cèl·lules vives/cm² per a les cèl·lules mesenquimals. Els cultius de cèl·lules mesenquimals es ressemblen, quan les cèl·lules es troben en plena fase exponencial, en un nou flascó de cultiu i amb els mil·lilitres de medi nou corresponent a la mida del flascó. D'aquesta manera es proporciona de nou a les cèl·lules tots aquells nutrients que s'estaven exhaustint (glucosa, glutamina, altres aminoàcids, vitamines o components del sèrum) i s'eliminen tots aquells subproductes cel·lulars que poden tenir un efecte tòxic per a la cèl·lula (amoni i lactat que acidifica el medi).

Al cultivar cèl·lules animals adherents, per a la realització de la ressebra cal provocar el desenganxament de les cèl·lules, i a continuació ja es pot procedir al recompte cel·lular. Un cop s'ha realitzat el recompte cel·lular ja es pot calcular el volum de medi amb cèl·lules que cal centrifugar per a poder obtenir l'inòcul desitjat en el nou cultiu. Aquest càlcul es porta a terme aplicant la següent equació:

$$V = \frac{C_{C2} \cdot A_2}{C_{C1}} \quad \text{Equació 7.3}$$

on

V és el volum de cultiu vell en mil·lilitres que cal centrifugar,

A₂ és l'àrea del flascó nou al que és realitzarà la ressebra,

C_{C1} és la concentració cel·lular recomptada en la solució de cèl·lules desenganxades (en cèl·lules/mL),

C_{C2} és la concentració cel·lular l'inòcul que es vol tenir en el cultiu nou (en cèl·lules/cm²).

Un cop calculat el volum de medi amb les cèl·lules desenganxades, aquest ja es pot centrifugar a 500g durant 5 minuts, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb el corresponent volum de medi fresc prèviament temperat segons el flascó de cultiu nou i es posa al seu interior. El nou cultiu ja es pot posar a incubar a 37°C , 90% d'humitat i 5% de CO₂.

7.2.4 Deshaderiment de cultius de cèl·lules animals adherents

En el cas de les cèl·lules adherents, per poder realitzar una ressebra, un recompte cel·lular o simplement poder disposar de les cèl·lules adherides en un flascó, primerament s'ha de desenganxar les cèl·lules de la superfície de creixement. L'ús de tripsina (enzim que degrada les proteïnes d'adhesió), és el mètode més emprat. A continuació es descriu el protocol a utilitzar amb els volums adequats dels medis per a la tripsinització d'un flascó de 25 cm².

- Retirar el sobrenedant.
- Afegir 2 mL de PBS per a rentar el flascó de restes de sèrum (el sèrum inactiva l'efecte de la tripsina).
- Afegir entre 0,5 i 1 mL de solució de tripsina (0,05% de tripsina (Invitrogen) en EDTA) i incubar a 37°C durant uns 5 minuts. S'ha d'anar comprovant visualment si les cèl·lules es

desenganxen, per no allargar aquest pas més temps del necessari i evitar que els efectes de la tripsina puguin degradar la membrana de la cèl·lula.

- Un cop desenganxades, afegir el doble de volum de medi amb 10% de sèrum que de solució de tripsina afegida i homogeneïtzar. El sèrum degut al seu alt contingut proteic inhibeix l'efecte de la tripsina sobre les cèl·lules.

7.2.5 Control de l'esterilitat dels cultius cel·lulars

Les característiques intrínseques dels cultius de cèl·lules animals, velocitats de creixement cel·lular lentes i medis molt rics en nutrients, fan que aquests cultius siguin molt susceptibles a possibles contaminacions. Per aquest motiu, una extremada cura en tots els processos de manipulació i un control regular de l'esterilitat dels cultius són dos factors bàsics per evitar l'aparició de qualsevol contaminació en la línia cel·lular i d'aquesta manera poder realitzar un correcte manteniment de la línia cel·lular.

La contaminació per bacteris, fongs o llevats es comprova regularment observant els cultius directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. En determinades ocasions es pot deduir que hi ha contaminació quan s'observen canvis en el color i terbolesa del medi de cultiu. També és important realitzar un control regular de l'esterilitat dels medis de cultiu i de les diferents solucions emprades durant els experiments com per exemple tripsina, PBS o aigua destil·lada. Per a realitzar aquest control posar uns 2-3 mL del medi o solució que es desitja comprovar en un dels pous d'una placa de 12 pous i incubar a 37°C durant un o dos dies. Després observar el contingut del pou directament al microscopi òptic invertit de contrast de fase. També és convenient realitzar aquesta operació sempre que es cregui que hi hagi hagut un procés de manipulació dubtós de qualsevol de les solucions suposadament estèrils utilitzades.

7.3 Medis de cultiu i sèrums.

Els medis de cultiu difereixen molt en funció de l'organisme que s'utilitza. Normalment per soques de línies cel·lulars d'animals els medis s'adquireixen ja preparats, bé sigui en format líquid o en pols. Durant aquest treball s'han utilitzat medis en format líquid comercials als quals no els cal

cap procediment previ d'esterilització, només els hi resta afegir els suplementes necessaris, que provenen de solucions estoc estèrils.

7.3.1 Medi base de cultiu de cèl·lules mare mesenquimals adultes.

El medi base que s'utilitza pel cultiu de cèl·lules mesenquimals humanes és el *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Low Glucose (31885-049, Invitrogen). Aquest medi líquid comercial conté les sals inorgàniques, aminoàcids i vitamines imprescindibles pel creixement de les cèl·lules animals. La seva composició es troba detallada a continuació a la taula 7.1.

Taula 7.1 Composició del medi base de cultiu de cèl·lules mesenquimals, el DMEM.

Components (g/l)					
Sals Inorgàniques		Aminoàcids		Vitamines	
CaCl ₂	0.214	L-Arginine·HC	0.084	Choline Chloride	0.004
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001	L-Cystine·2HCl	0.0626	Folic acid	0.004
MgSO ₄	0.200	L-Glutamine	0.584	Myo-Inositol	0.0072
KCl	0.4	L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.042	Niacinamide	0.004
NaHCO ₃	3.7	L-Isoleucine	0.105	D-Pantothenic acid·½Ca	0.004
NaCl	6.4	L-Leucine	0.105	Pyridoxal·HCl	0.004
NaH ₂ PO ₄	0.111	L-Lysine·HCl	0.146	Riboflavin	0.0004
		L-Methionine	0.030	Thiamine·HCl	0.004
		L-Phenylalanine	0.066		
		Glycine	0.03		
		L-Serine	0.042		
		L-Threonine	0.095		
Altres		L-Tryptophan	0.016		
D-Glucose	1	L-Tyrosine·2Na·H ₂ O	0.072		
Phenol Red·Na	0.015	L-Valine	0.094		

7.3.2 El sèrum, suplement de medis de cultiu per cèl·lules animals.

Aquesta variabilitat de components i factors presents en els sèrum fa que el creixement de cada línia cel·lular es pugui veure influenciat de diferents maneres, no només per el tipus de sèrum

utilitzat, sinó que el propi lot del sèrum també pren molta importància. Això fa que per a la utilització de un lot diferent de sèrum, se n'hagi de testar el creixement. A la taula 7.2 es mostren els tipus de sèrum utilitzats per a les diferents línies cel·lulars cultivades.

Taula 7.2 Sèrums corresponents pel cultiu de les diferents línies cel·lulars utilitzades.

Línia cel·lular	Sèrum
Mesenquimals de moll d'os humanes	10% Sèrum AB humà
Mesenquimals de moll d'os d'ovella	10% <i>Foetal Bobine Serum</i> o pool autòleg oví
Mesenquimals de cartílag d'ovella	10% <i>Foetal Bobine Serum</i> o pool autòleg oví
Mesenquimals de teixit adipós d'ovella	10% <i>Foetal Bobine Serum</i> o pool autòleg oví

El sèrum FBS emprat als experiments és subministrat per Invitrogen (10108-165, lot 462115F) en ampolles de 500 mL i s'emmagatzema a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sèrum AB humà és subministrat per el Banc de Sang i Teixits de Catalunya. En canvi el sèrum autòleg oví es produïa al laboratori mitjançant el següent protocol:

7.3.2.1 Extracció de sang.

- S'immobilitza l'ovella, es rasura la zona de la jugular, es neteja i s'esterilitza amb povidona iodada.
- Es punxa la jugular i s'extreu un volum de sang entre 100 i 250 mL (considerant que s'obtindrà aproximadament la meitat de sèrum) amb una bossa d'extracció de sang (Grifols).
- Un cop s'aconsegueix el volum desitjat, es pinça el tub i s'extreu l'agulla per que no entri aire.
- Es fan 3 nusos al tub on hi ha l'agulla i es talla l'agulla per evitar punxades accidentals.

- Es manté la bossa a temperatura ambient entre 1 i 4 hores per que es formi el quall.

7.3.2.2 Processament al laboratori.

- S'observa que les bosses tinguin un coàgul, si és així es procedeix al següent pas.
- Es pesen les bosses de sang per tal d'equilibrar-les a la centrífuga. En cas que la diferència de pes entre parelles sigui més gran de 5 g s'han d'afegir elements per igualar els pesos a la centrífuga.
- Es fa una centrifugació de les bosses amb posició vertical amb la presa de mostres a la part superior, utilitzant la centrífuga Beckman amb les condicions següents:

Rotor J10; 1300 g (en aquest cas 2800 rpm); 25 minuts; 22°C; Acceleració 2; Fre 1.

- Les bosses es mantenen en posició vertical en un suport amb peu i aguantades amb unes pinces per a que no es barregi el quall.
- Es punxa un dels ports de la bossa amb el punxó perforador estèril.
- Es desenrosca el tap i es buida el contingut de la bossa en tubs falcons de 50 mL aguantant el quall per a que no bloquegi la sortida del líquid.
- Es centrifuguen els tubs falcons utilitzant la centrífuga Beckman amb les condicions següents:

Rotor J18; 1300 g (en aquest cas 3000 rpm); 25 minuts; 22°C; Acceleració 2; Fre 1.

- Es treu el sèrum dels tubs falcons evitant emportar-se els eritròcits del pèl·let i es posa en tubs falcons de 50 mL nous.
- Es centrifuguen els tubs falcons utilitzant la centrífuga Beckman amb les condicions següents:

Rotor J18; 1300 g (en aquest cas 3000 rpm); 25 minuts; 22°C; Acceleració 2; Fre 1.

- Es treu el sèrum dels tubs falcons evitant emportar-se els eritròcits del pèl·let i s'aliquota en tubs falcons de 50 mL nous omplint-los fins a 46 mL.
- Es tanquen bé els tubs falcons i es segellen amb parafilm.
- S'identifiquen amb el lot corresponent a cada ovella.
- Es congelen els tubs falcons a -20°C un temps mínim de 12h.
- Es descongelen els tubs falcons a temperatura ambient.
- Es realitza un test d'esterilitat amb plaques de 12 pous, testant el sèrum amb un medi ric en nutrients (DMEM, *Tryptose Broth* (Invitrogen)) 50%.
- Es congelen els sèrums a -20°C.
- Es deixen els tests a l'incubador de CO₂ a 37°C durant 7-10 dies.
- Un cop s'ha considerat que els tests d'esterilitat són correctes es pot inactivar per fer un pool (en el cas que es vulgui utilitzar com a sèrum no autòleg).
- Es descongelen els sèrums a temperatura ambient.
- Es posen a un bany preescalfat a 56°C durant 30 minuts.
- S'ajunten totes les alíquotes de sèrum en un recipient estèril i s'homogeneïtza bé amb una pipeta de 50mL.
- S'aliquota el sèrum amb pipetes de 50 mL en tubs falcons de 50 mL fins a 46mL excepte la ultima alíquota.
- S'identifiquen amb un nou lot corresponent a les ovelles de les quals prové el sèrum.
- Es realitza un test d'esterilitat amb plaques de 12 pous, testant el sèrum amb un medi ric en nutrients (DMEM, *Tryptose Broth*) 50%.
- Es congela a -20°C.
- Es deixen els tests a l'incubador de CO₂ a 37°C durant 7 – 10 dies.
- S'observen els tests d'esterilitat microscòpicament per veure qualsevol contaminació

7.4 Sistemes de cultiu de cèl·lules animals.

Al llarg del treball, els cultius de cèl·lules animals adherents s'han efectuat en diferents equips de cultiu descrits a continuació. Es poden diferenciar en dos grups bàsics, els sistemes

comercials de cultiu estàtic, utilitzats pel cultiu rutinari de les diferents línies de cultiu i també com a cultius control amb mesures fora de línia dels experiments realitzats.

7.4.1 Sistemes comercials de cultiu estàtic.

Són sistemes estàndards pel cultiu tant de cèl·lules animals en suspensió com de cèl·lules animals adherents. En el cas de les cèl·lules animals adherents, el volum de treball de medi ve donat a partir la relació de 1 mil·lilitre per cada 3 cm² de superfície de cultiu. Dins dels sistemes comercials de cultiu estàtic, se n'utilitzen de diferents tipus al llarg del treball segons la utilitat desitjada, tal i com es descriu a continuació:

Els flascons de cultiu de poliestirè que s'utilitzen ja s'adquireixen estèrils. S'empren models diferents segons la superfície de cultiu: els de 25, 75 i 150 cm² segons la quantitat desitjada de cèl·lules i la seva grandària. La presència d'un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus en el tap dels flascons permet el control del pH mitjançant l'intercanvi de gasos amb l'atmosfera controlada de CO₂ de l'incubador. Aquests flascons s'han utilitzat bàsicament per mantenir les ressembres de les línies cel·lulars, i realitzar els escalats de les cèl·lules a partir de què es preparen els inòculs per als diferents experiments.

Les plaques de 6, 12 i 24 pous, que es subministren estèrils, són de poliestirè d'alta qualitat i baixes en toxines i disposen d'una superfície de creixement per cèl·lules adherents de 8,92 cm². Han estat utilitzades pels creixements control en els experiments, per a la realització de recomptes cel·lulars fora de línia i per la diferenciació condrogènica, adipogènica i osteogènica. Les condicions d'ús estàndard, per exemple, les utilitzades per a les plaques de 6 pous en els experiments són la utilització de 3 mL del medi de cultiu corresponent segons la línia cel·lular utilitzada i situada a l'interior d'un incubador que manté una temperatura de 37°C i una atmosfera controlada d'aire amb CO₂.

7.5 Mètodes analítics.

Els diferents mètodes analítics utilitzats es comentaran a continuació.

7.5.1 Anàlisi de la concentració cel·lular.

Per tal de conèixer la concentració cel·lular present en un cultiu de cèl·lules animals adherents, s'utilitza un microscopi invertit de contrast de fases (Nikon, TMS) i un hematocitòmetre (*Improved Neubauer Chamber*, Brand). L'hematocitòmetre és un portaobjectes amb quatre camps d'un volum de mostra conegut i que contenen setze requadres gravats que faciliten el recompte de les cèl·lules presents a cada camp. El recompte cel·lular dels cultius de cèl·lules animals adherents varia segons la superfície de cultiu a la que es dugui a terme el creixement cel·lular.

7.5.1.1 Recompte directe.

Quan el creixement del cultiu es realitza en monocapa sobre una superfície de cultiu plana, aleshores es pot realitzar una mesura directe del nombre de cèl·lules viables, mortes, totals i el percentatge de viabilitat que presenta el cultiu.

Prèviament a efectuar el recompte cel·lular, s'ha de procedir al desenganxament de les cèl·lules protocol que s'ha de complementar amb un protocol de concentració cel·lular quan es sospita que la concentració cel·lular de la solució contenidora de les cèl·lules és massa petita pel recompte en hematocitòmetre, com per exemple quan es troben a estats inicials del creixement, o tenim unes superfícies de creixement petites. Aquest protocol de concentració cel·lular es resumeix a continuació:

- Agafar una quantitat coneguda del medi amb les cèl·lules i traspasar-ho en un eppendorf.
- Centrifugar a 500g durant 5 minuts.
- Aspirar el sobrenedant i resuspendre-ho en un volum petit conegut.

Un cop es té una solució cel·lular adequada ja es pot procedir al recompte de la concentració cel·lular. Per diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, aquestes es tenyeixen amb

una mescla 1:1 d'una dissolució de blau de tripà (Sigma, T8154) diluïda al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M a pH 7.4 o NaCl 0.9% (p/v). El colorant només penetra a l'interior de les cèl·lules mortes i els dóna un color blavós. Per contra, les cèl·lules vives es diferencien perfectament de les mortes pel seu color blanc brillant. Per realitzar l'observació al microscopi doncs es barregen 75 µL de mostra del cultiu amb 75 µL de blau de tripà al 0.2% (v/v). Una gota de la dilució es diposita a la zona de recompte de l'hematocitòmetre i es cobreix amb un cobreobjectes.

A continuació, es realitza el recompte de cèl·lules viables i mortes en cada un dels quatre camps. Els dos valors superior i inferior obtinguts, es rebutgen, mentre que dels altres dos se'n fa la mitjana. El càlcul de la concentració de cèl·lules present al cultiu es realitza mitjançant la següent fórmula:

$$[\text{Cèl·lules/ml}] = \frac{n_1 + n_2}{d \times V} = (n_1 + n_2) \cdot 1E + 04 \quad \text{Equació 7.4}$$

on

n_1 i n_2 són el nombre de cèl·lules comptades en els dos camps acceptats,

m és el nombre de camps comptats i té un valor de 2,

d és la dilució amb blau de tripà realitzada i el seu valor és de 0.5,

V és el volum de mostra present a cada camp i té un valor de 1E-04 mL.

Aquesta fórmula és aplicable a les cèl·lules viables i a les mortes. Un cop s'obté el número de cèl·lules per mil·lilitre de solució, s'ha de multiplicar pel volum total de tripsina i medi utilitzat pel desenganxament de les cèl·lules, tenint en compte si s'ha efectuat una concentració cel·lular, en els que s'afegeix el factor de concentració corresponent. Una vegada obtingut el número de cèl·lules totals, s'ha de dividir per la superfície de creixement utilitzada pel creixement cel·lular.

Finalment, Per obtenir el percentatge de viabilitat cal calcular el nombre total de cèl·lules (suma de les viables i de les mortes) i aplicar la següent expressió:

$$\text{Viabilitat [\%]} = \frac{\text{cèl·lules viables}}{\text{cèl·lules totals}} \cdot 100 \quad \text{Equació 7.5}$$

7.5.2 Anàlisi enzimàtic de la glucosa i lactat.

Les concentracions de glucosa i lactat de les mostres extretes durant els cultius es mesuren amb un analitzador automàtic de glucosa i lactat YSI (2700 Select). Aquest aparell

disposa d'un elèctrode format per una fina membrana amb enzims immobilitzats que envolta un ànode de platí. Les molècules de D-glucosa o L-lactat presents a la mostra difonen a través de la membrana, i pateixen una transformació enzimàtica per acció de la glucosa i la lactat oxidases, aquestes reaccions alliberen electrons que són finalment detectats per l'elèctrode. La intensitat dels senyals elèctrics produïts és proporcional a la concentració de cadascun dels dos substrats. La mesura elèctrica no es veu afectada pel color, terbolesa, densitat o temperatura de la mostra, i només precisa que l'alíquota presa per la mesura sigui filtrada o centrifugada amb anterioritat per tal d'eliminar les cèl·lules o impureses que puguin obstruir la membrana.

L'analitzador pren 25-50 µL de la mostra i retorna els valors corresponents de concentració de glucosa i lactat en g/L, amb un error aproximat de ± 0.1 g/L. El rang de concentracions que pot mesurar l'aparell oscil·la de 0.05 a 20.0 g/L per la glucosa i 0.05 a 2.00 g/L pel lactat. Quan les mostres estan excessivament concentrades és necessari diluir-les amb aigua ultrapura fins que les mesures entren en el rang de mesura.

7.5.3 Anàlisi genètic i histològic.

Al llarg del capítol 3, 4 i 5 s'han utilitzat estratègies de diferenciació cel·lular per induir els cultius de cèl·lules mare mesenquimals a la diferenciació cap a condrocits o avaluat les característiques del neoteixit format a partir dels tractaments aplicats a les lesions osteocondrals. Així, per tal de poder observar el grau de diferenciació obtingut en aquests cultius o teixits, cal efectuar anàlisis genètic, morfològic i histològic. Mentre que l'anàlisi morfològic es basa en una observació del cultiu cel·lular a través d'un microscopi invertit de contrast de fase, pels anàlisis genètic i histològic és necessari aplicar diferents tècniques sobre els cultius a analitzar. Aquestes tècniques es descriuen a continuació.

7.5.3.1 Purificació i quantificació del RNA total.

Les tècniques actuals d'anàlisi genètic d'un cultiu cel·lular es basa en determinar l'expressió gènica d'una població cel·lular a partir de l'amplificació del propi RNA missatger intracel·lular. L'amplificació del RNA missatger es realitza mitjançant la tècnica anomenada de *RT-*

PCR (reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa prèvia) que consisteix en una primera transcripció inversa, on es copia el RNA missatger en forma de cDNA i una posterior amplificació del cDNA a partir de la tècnica de PCR.

En conjunt, la tècnica per *RT-PCR* es pot considerar molt sensible pel que fa a la poca quantitat de RNA missatger necessari per a la correcta realització de la tècnica, i específica pel que fa a l'estudi concret de l'expressió de determinats gens, ja que per a l'inici del procés de còpia del RNA missatger i posterior amplificació es requereixen dos fragments complementaris al gen que es vol estudiar i que serveixen com a motlles, amplificant de forma específica el gen a estudiar. Per tal de poder analitzar l'RNA, primer s'ha d'aïllar de la resta de components cel·lulars i amplificar-lo per tal que sigui més fàcil de detectar. Per tal d'aconseguir aquest propòsit, cal seguir el protocol l'indicat en el Kit RNeasy Mini de *Qiagen*, que s'aplica a una població cel·lular en suspensió (provinents de la tripsinització d'una monocapa o de la disgregació d'un polímer), i amb una concentració cel·lular recomanable de $4 \cdot 10^5$ cel/mL. Aquest protocol és el següent:

- Es trenca amb 350 μ l de *buffer* RLT i s'homogeneïtza la mostra (s'han d'afegir 10 μ l de β -mercaptoetanol per cada mL de *buffer* RLT que s'hagi d'utilitzar). S'afegeix el mateix volum que tenim d'etanol al 70%. No s'ha de centrifugar després d'afegir etanol.
- Transferir la mostra a la columna RNeasy en un tub de 2 mL. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 350 μ l de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 10 μ l de DNase I *stock solution* a 70 μ l de *Buffer* RDD. Barrejar generosament invertint el tub i centrifugar breument.
- Afegir DNase I *incubation mix* (80 μ l) directament sobre la membrana de la columna i col·locar a durant (20-30°C) 15 minuts.
- Afegir 350 μ l de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 500 μ l de *buffer* RPE a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Afegir 350 μ l de *buffer* RW1 a la columna RNeasy. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.
- Col·locar la columna RNeasy en un tub de 2 mL nou, centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut.

- Col·locar la columna RNeasy en un tub de 1.5 mL nou. Afegir 30-50 µl d'aigua RNase free. Centrifugar durant 15 segons a un mínim de 8000g, descartar el líquid que ha travessat la columna.

7.5.3.2 Reacció en cadena de la Polimerasa amb transcripció inversa prèvia (RT-PCR).

Un cop es disposa del RNA aïllat i analitzat, ja es pot procedir a la seva amplificació, utilitzant el Kit *Titan one tub RT-PCR kit*. El protocol es descriu a continuació:

- Es preparen les solucions mare I i II (taula 7.4.).
- S'afegeix la solució mare I a la solució mare II de cada gen, es dona un cop al tub per homogeneïtzar i es centrifuga breument per tenir la solució en el fons del tub de PCR.
- Es col·loquen els tubs de PCR en el termociclador *Gene Cycler (Bio-Rad)* i s'inicia la seqüència d'amplificació que es mostra a la 7.6.
- Una vegada ha finalitzat la RT-PCR, es pot observar el material amplificat a partir de l'addició del material resultant en un gel d'agarosa al 2% p/v amb la posterior aplicació d'un camp elèctric.

Taula 7.4. Composició de les solucions mare I i II. Els oligos (FW i RV) es poden observar a la taula 7.5.

Solució Mare I				Solució Mare II		
Component	Control	Mostra	Concentració final	Component	Control	Mostra
Aigua estèril	10.5 µL	14.5 µL	-	Tampó RT-PCR (5x)	10 µL	10 µL
dNTP mix	4 µL	4 µL	0,2 mM	Mescla enzimàtica	1 µL	1 µL
Solució DTT	2.5 µL	2.5 µL	5mM	Aigua estèril	14 µL	14 µL
Inhibidor RNasa	1 µL	1 µL	5U	Volum total	25 µL	25 µL
Oligo control	2 µL	-	0,4µM			
Oligo FW	-	1 µL	0,4µM			
Oligo RV	-	1 µL	0,4µM			
RNA control	5 µL	-	10 pg			
RNA motlle	-	1 µL	1µg-1pg			
Volum total	25 µL	25 µL	-			

Taula 7.5 Seqüències i propietats dels oligos utilitzats en les RT-PCR al llarg del treball.

Gen	Oligo	Mida oligo (bases)	Tm (°C)	Mida gen (bp)
GAPDH FW	CGGATTTGGTCGTATTGG	18	53	861
GAPDH RV	TCAAAGGTGGAGGAGTGG	18	53,4	861
Col·lagen tipus II FW	ACGGTGGACGAGGTCTGACT	20	65	141
Col·lagen tipus II RV	GGCCTGTCTCTCCACGTTCA	20	65	141
Col·lagen tipus I FW	CCACCAGTCACCTGCGTACA	20	65	460
Col·lagen tipus I RV	GGAGACCACGAGGACCAGAA	20	65	460
Aggrecan FW	CCGCTATGACGCCATCTGCT	20	65	375
Aggrecan RV	TGCACGACGAGGTCCTCACT	20	65	375
Byglican FW	CCATGCTGAACGATGAGGAA	20	65	204
Byglican RV	CATTATTCTGCAGGTCCAGC	20	65	204
TGFb FW	CGGCAGCTGTACATTGACTT	20	60	271
TGFb RV	AGCGCACGATCATGTTGGAC	20	60	271

Taula 7.6 Seqüència d'amplificació utilitzada en el termociclador *Gene Cycler* (Bio-Rad).

Nº de cicles	Temperatura(°C)	Duració(min.)	Funció
1	50	30	Transcripció ARN-cADN
1	94	2	Desnaturalització motlle
35	94	0,5	Desnaturalització
	55	0,5	Unió motlle-oligos
	68	1	Allargament
1	68	7	Allargament addicional

Els resultats obtinguts s'han anat mostrant al llarg del capítol 4 en els corresponents apartats d'anàlisi genètic per a les aplicacions a la diferenciació condrocitària.

7.5.4 Inclusió en parafina per histologia o criòstat.

Cal processar les mostres per tal de poder fer blocs de parafina que posteriorment es tallen al micròtom. El criòstat és un micròtom dintre d'una cambra que es troba a -20°C, per tant les mostres han d'estar congelades. En aquest cas s'utilitza CO₂ gas i un crioprotector per a teixits (Tissutek®), per congelar la mostra i així poder tallar al criòstat. En canvi la parafinització és un procés que consta de banys successius en alcohols de graduació creixent, per deshidratar la mostra, seguits de 2 banys en xilè (aclariment) que fan de pont entre l'alcohol i la parafina. Posteriorment les mostres passen per 2 banys calents de parafina líquida (infiltració). El procés detallat és el següent:

- Treure les mostres del fixador (formol o paraformaldehid).
- Netejar-les amb aigua corrent sota l'aixeta.
- Afegir etanol (OH) 50°: 1 hora temperatura ambient.
- Afegir OH 60°: 1 hora temperatura ambient.
- Afegir OH 70°: Fins l'endemà.
- Afegir OH 80°: 1 hora temperatura ambient.
- Afegir OH 96°: 1 hora temperatura ambient.
- Afegir OH 96°: 1 h temperatura ambient.
- Afegir OH Absolut: 1 hora temperatura ambient.
- Afegir OH Absolut: 1 h temperatura ambient.
- Afegir Xilè I: 15 minuts temperatura ambient.
- Afegir Xilè II: 15 - 30 minuts temperatura ambient .
- Afegir Parafina I: Fins l'endemà.
- Afegir Parafina II: Mínim 3 – 4 hores.

7.5.5 Hematoxilina-Eosina.

Aquesta tècnica ens permet tenyir qualsevol tipus cel·lular i observar el nucli i el citoplasma diferenciats. La Eosina és un colorat àcid que tenyeix els nuclis de blau i l'hematoxilina el citoplasma de rosa. Les solucions que s'utilitzaran són les següents:

- Alcohol-clorhídric (OH-HCl): HCl 2.5% en OH 96°.
- Aigua Amoniacal: Amoníac 0.3% en aigua destil·lada.

El protocol seguit és el següent:

- Desparafinar i hidratar fins l'aigua destil·lada.
- Incubar amb Hematoxilina de Harris durant 3 minuts.
- Posar 5 minuts sota l'aixeta amb aigua corrent.
- Realitzar diferents passes consecutius de OH-HCL, aigua corrent, aigua amoniacal i aigua corrent.
- Finalment es tenyeix amb Eosina 5 minuts.

7.5.6 Histologia de Safranina O.

L'anàlisi histològic i Immunohistoquímic permet, mitjançant la utilització de colorants específics i anticossos respectivament, un estudi ampli de l'estructura cel·lular i morfològica de les cèl·lules que es troben incloses en teixits d'interès. Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, la histologia de Safranina O permet tenyir cartílag, mucines i mastòcits. Tenyeix de color vermell-carabassa els glicosaminoglicans de la matriu extracel·lular cartilaginosa, de color negre els nuclis i de color verd-gris el citoplasma. El protocol d'aquesta tècnica, que es duu a terme a partir de mostres prèviament parafinades i tallades del polímer a analitzar, es detalla a continuació:

- Desparafinar i hidratar amb aigua destil·lada.
- Incubar amb Hematoxilina de Weighert durant 10 minuts.
- Deixar 10 minuts sota l'aixeta amb aigua corrent.
- Incubar amb 0.02% Fast Green (44715, Fluka) durant 5 minuts.
- Es fa un pas per àcid acètic 1% durant 3 segons.
- Incubar amb Safranina O (84120, Fluka) 0.1% durant 5 minuts.
- Es fan 10 passos amb Alcohol de 70°.
- Es fan 10 passos amb Alcohol de 90°.
- Es fan 10 passos amb Alcohol absolut.
- Es fan 10 passos amb Xilè.

7.5.7 Immunohistoquímica per Col·lagen tipus II.

La immunohistoquímica ens permetrà saber, d'aquells teixits o agregats cel·lulars que es puguin fixar en un lloc de parafina, la expressió o no de la proteïna col·lagen tipus II característica del cartílag hialí. Aquesta tècnica ofereix una precisió molt alta ja que es basa en la utilització d'anticossos específics, prèviament marcat amb una molècula fluorescent, per la detecció d'antígens sobre mostres tissulars o citològiques. Els reactius principals són l'anticòs primari de col·lagen II (Chemicón ref.: MAB 8887), l'anticòs secundari i la streptavidina (KIT DAKO Cytomation LSAB2 System-HRP. ref.: K0675) i el Líquid *DAB Substrate-Chromogen system* de grau per a ús en laboratori. El protocol a seguir és el següent:

- Les mostres histològiques es deixen a l'estufa 24 hores a 37 °C.
- Desparafinar i hidratar.
- Realitzar el desemmascament enzimàtic (Pepsina 0.1% en HCl 0.01N) durant 20 minuts a temperatura ambient.
- Fer dos rentats amb PBS de 5 minuts cada un.
- Bloquejar la peroxidasa endògena amb H₂O₂ 3% en aigua durant 30 minuts en una cubeta d'agitació a temperatura ambient.
- Realitzar 3 rentats de 5 minuts amb PBS+ 0,1 Tritó (100 mL de PBS + 100µL de Tritó X-100).
- Bloquejar unions inespecífiques amb 3% BSA PBS+Tritó durant 1 hora i 30 minuts a temperatura ambient. Decantar l'excés, no rentar.
- Aplicar l'anticòs primari (dilució 1:200 en 1% BSA en PBS-0.1%Tritó), amb 1mL per 10 portes (100µL per porta) posant-ho en eppendorf o tub petit durant tota la nit a 4°C (es pot cobrir amb parafilm). Pel control negatiu, enlloc de l'anticòs primari, utilitzar 1% BSA en PBS-0.1%Tritó.
- Realitzar 3 Rentats de 5 minuts amb PBS+ 0.1 Tritó.
- Aplicar l'anticòs secundari KIT DAKO 1 durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Realitzar 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tritó.
- Incubació en Streptavidina Kit Dako2 durant 10 minuts a temperatura ambient.
- Realitzar 3 rentats de 5 minuts amb PBS.
- Revelar amb Diaminobencidina (DAB). 20mL de PBS més una alíquota de DAB a(450 µL a 25 mg/mL) + 2 µL de H₂O₂. Filtrar amb una xeringa Afegir la DAB a les preparacions i es controla el color del teixit microscòpicament durant 5 minuts. Per a parar la reacció es submergeix la

preparació en PBS. Si no puja molt el color es poden deixar una estona més, però si tarda molt es poden retirar les mostres.

- Rentar amb aigua destil·lada.
- Incubar amb Hematoxilina de Mayer 25% en aigua desmineralitzada durant 1 minut.
- Rentar amb aigua corrent fins que viri i efectuar el corresponent muntatge.

7.5.8 Anàlisi de la diferenciació condrogènica *in vitro*.

La diferenciació *in vitro* és un dels anàlisis a realitzar per demostrar la multipotencialitat de les CMMA. Un cop les línies cel·lulars han estat establertes, es pot realitzar l'assaig quan es té un nombre mínim de cèl·lules, al voltant de $8E+06$ cèl·lules. S'obté una suspensió cel·lular i es realitzen els passos següents per aconseguir el cultiu de pèl·let per a l'assaig condrogènic:

- Amb la concentració cel·lular obtinguda (CT) es calcula el volum amb el qual s'ha de resuspendre les cèl·lules per obtenir una concentració final (CF) de $1.6E+07$ cèl·l/mL.
- Centrifugar el volum que conté les CT a 400g durant 10 minuts.
- Resuspendre el pèl·let en DMEM suplementat amb sèrum autòleg ovi al 10%.
- Amb una placa de cultiu de 24 pous, omplir els espais buits entre els pous amb PBS estèril per generar unes condicions de màxima humitat que es requereix per la generació de *micromass pellet*.
- Generar cultius de *micromass pellet* sembrant gotes de 5 μ L de la solució cel·lular concentrada en el centre de cada pou.
- Després de cultivar durant 2 hores en condicions de màxima humitat, s'afegeixen 2mL de medi de condrogènesis atemperat i es deixa a l'incubador de CO₂ a 37 °C i 5%CO₂.
- Es realitza un recanvi de medi amb suplementes de diferenciació cada 3-4 dies.
- Mantenir en cultiu durant 15-20 dies.
- Retirar el medi i rentar amb PBS.
- Fixar amb paraformaldehid 4% durant 30 minuts.
- Rentar amb paraformaldehid 4% amb PBS dos cops.
- Rentar ràpidament amb àcid acètic 1% durant 10 segons.
- Tenyir amb safranina O 0.01% durant 5 minuts.
- Rentar amb PBS dos cops, afegir aigua destil·lada per neutralitzar l'acidesa, visualitzar al microscopi i fotografiar els *micromass pellet*.

7.5.8. Citometria de flux.

Per analitzar el fenotip de les diferents cèl·lules mesenquimals s'utilitza la tècnica de citometria de flux. El citòmetre de flux és un aparell que ens permet identificar la presència o absència d'una determinada proteïna prèviament marcada amb un anticòs unit a una molècula fluorescent.

Es van estudiar un conjunt de marcadors o proteïnes de superfície. Els marcadors de superfície (sovint abreviats com CD, de *cluster of differentiation*) són proteïnes de membrana amb un domini extracel·lular, l'expressió o absència de les quals permet identificar un estat o tipus cel·lular.

Els anticossos utilitzats són els de la taula 7.7.

Taula 7.7. Anticossos utilitzat per a la determinació fenotípica de les CMMA per citometria de flux.

Anticòs	Marcatge	Isotip	Casa comercial	Referència	Clon
CD-45	PE	IgG1	BD Biosciences	556627	5H9
CD-44	FITC	IgG2bK	BD Biosciences	555478	G44-26
CD-90	PE	IgG1	BD Biosciences	555596	5E10
HLA-DR	FITC	IgG2bK	BD Biosciences	555560	TU36
Control isotip IgG1	PE	IgG1	BD Biosciences	340416	X40
Control isotip IgG2bK	FITC	IgG2bK	BD Biosciences	555742	27-35

El protocol seguit va ser el següent:

- Posar 5 uL de cada un dels anticossos en tubs de propilè de fons rodó de 4mL per a FACS (un per a FITC i l'altre per a PE).
- Posar 100 uL de la suspensió cel·lular en cada tub.
- Incubar durant 15 minuts a temperatura ambient i en la foscor.
- Afegir 2 mL de PBS i passar pel vòrtex suaument.

- Centrifugar 5 min a 330 g , decantar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb 200 uL de PBS.
- Analitzar el més aviat possible (màxim 1h) amb el citòmetre (FACS Calibur, BD Biosciences®) utilitzant el protocol corresponent per a cada parella de marcadors. S'analitzaran unes 10.000 cèl·lules viables per a cada marcador.

7.6 Mesures fora de línia: creixements paral·lels.

Al llarg dels diferents capítols s'ha vist necessari l'obtenció de mesures de concentració cel·lular efectuades fora de línia com a contramesura per a les diferents mesures en línia desenvolupades al llarg del treball. Tal i com ja s'ha comentat a la introducció, un dels problemes de les mesures fora de línia de la concentració cel·lular és la necessitat de destrucció del cultiu cel·lular per tal de poder realitzar aquesta mesura. A més, al tractar-se de sistemes biològics, cal efectuar repeticions de les mesures per tal de poder tenir una dada estadísticament més exacta, fent que es necessiti una gran quantitat de creixements en paral·lel per a poder obtenir el seguiment de la concentració cel·lular fora de línia al llarg d'un experiment. Aquest fet, fa que sigui necessari efectuar la inoculació d'aquests creixements en paral·lel amb una alta repetibilitat, de manera que s'ha seguit el protocol següent:

- Calcular el número de mesures de concentració a fer (dies a mesurar, diferents cultius i repeticions).
- Calcular el número de cèl·lules totals per engegar l'experiment a partir de la concentració de l'inòcul a utilitzar en l'experiment, multiplicat pel número total de mesures de concentració (tenint en compte 2 mesures extra més per pal·liar possibles pèrdues de volum).
- Calcular volum total de l'inòcul comú tenint en compte que s'utilitzarà 1 mL de l'inòcul comú per cada una de les mesures a fer (tenir en compte les 2 mesures extra).
- Tripsinitzar les cèl·lules del preinòcul, separar el número de cèl·lules totals necessàries per l'experiment i resuspendre-les en el volum total de l'inòcul comú del medi de cultiu corresponent.
- Inocular amb 1 mL de la barreja de cèl·lules i medi de cultiu a cada un dels pous de cultiu d'una placa de 6 pous . S'ha de tenir en compte que, per aconseguir l'elevat grau d'homogeneïtat necessari per a obtenir unes mesures repetitives, cal agitar (suaument) constantment la barreja de cèl·lules i medi.




- Afegir la resta de medi de cultiu a cada un dels pous fins a arribar al volum de treball corresponent.






7.7 Fabricació de matrius de PLGA.

Per la fabricació de matrius de Poly Lactic Glycolic Acid (PLGA) s'utilitza el polímer comercial de la casa NP Pharm, de característiques PLGA 50:50 inherent i de viscositat 0.55-0.75. Per a la generació de porus per a la colonització dels polímers resultants, s'utilitza Clorur Sòdic tamisat, mentre que com a dissolvent s'utilitza cloroform. La relació de polímer i porògen que s'utilitza és 1:9.

El protocol utilitzat és el que s'il·lustra a la taula 7.8 i es descriu a continuació (Caminal 2006) :

Taula 7.8. Esquema del procés per a la fabricació de cilindres de PLGA mitjançant el filtrat del porògen per obtenir una determinada porositat.

<p>1. En primer lloc es col·loca el porògen en el tamissador per a seleccionar el rang dels les partícules de clorur sòdic. Es tamissa durant 30 minuts.</p>	
<p>2. Un cop tamissat s'obtenen porògen de diferents mides. A la imatge tenim porògen de mida $0,3 < \varnothing < 0,5$ mm.</p>	
<p>3. Les partícules de PLGA són unes esferes de color groc, tal i com s'observa a la imatge.</p>	

<p>4. Per fer les matrius, es pesen el porògen i el PLGA, tal i com indica l'apartat 7.7 de Materials i Mètodes. Es dissol amb 15 mL de cloroform (triclorometà o triclorur de metil) amb l'ajuda d'un agitador magnètic.</p>	
<p>5. Un cop dissolt el PLGA en cloroform, amb un vidre de rellotge es col·loca la dissolució i s'aboca el porògen (clorur de sodi) a poc a poc. Tal i com es va abocant el clorur de sodi, es va remenant fins que el porògen ocupa tot l'espai i el cloroform s'evapora.</p>	
<p>6. Per a formar la matriu, la mescla de porògen amb PLGA dissolt es modela per a que tingui una forma de moneda amb un gruix aproximat de 8-10mm. Un cop està sec és col·loca en abundant aigua destil·lada per a eliminar el porògen. Normalment es deixa tota la nit per treure tot el porògen de la matriu.</p>	
<p>7. Un cop les matrius s'assequen del rentat amb aigua per treure el porògen, es congelen durant 24 hores i s'han de liofilitzar per extreure qualsevol traça del dissolvent orgànic (cloroform). El procés dura unes 30-48 hores.</p>	
<p>8. Finalment, quan la matriu ja està liofilitzada, es van tallant els cilindres amb un Biopunch de biòpsia com els que es veuen a la imatge. S'utilitza el de diàmetre de 4mm. Un cop es tallen, s'esterilitzen amb raigs gamma dintre d'un rang d'irradiació acumulada entre 15-25 Gy.</p>	

7.7.1 Colonització de matrius de PLGA.

En primer lloc s'ha d'esterilitzar tot el material amb el que es treballa. Si la colonització es fa amb minibioreactor, es punxa el port polarogràfic amb una agulla estèril de 0,5x15mm, prèviament taponat amb un cilindre de tefló. L'agulla ha d'estar inclinada cap a la paret i al fons, i sense tocar amb els guants l'interior del minibioreactor es punxa la matriu per el centre del cilindre deixant-la en un pla axial per a la seva colonització. Es col·loquen els filtres, s'empaqueta el conjunt en bosses individuals i es s'esterilitza mitjançant radiació gamma a una potència variable entre 15 i 25 KGy.

- Un cop tenim les cèl·lules que es volen introduir a dintre la matriu es resuspenen en medi DMEM+10% Sèrum en un volum de 9-10 mL. Les cèl·lules resuspeses s'introdueixen estèrilment a dintre del minibioreactor tal i com es mostra en la figura 7.2.



Figura 7.2. Minibioreactor preparat per a la colonització.

- El minibioreactor es col·loca en un placa magnètica amb control electrònic de l'agitació. El rang de velocitats ha d'estar entre 120 i 200 rpm.
- Si es vol continuar l'experiment, un cop transcorregut el temps de colonització, es retira el medi amb les cèl·lules restants i es recanvia per medi fresc DMEM+10%FCS.

7.8 Càlculs.

Al llarg del treball s'han anat realitzant un seguit de càlculs, ja sigui pel càlcul de paràmetres del cultiu cel·lular, com la velocitat màxima de creixement, velocitats específiques de consum de glucosa i de producció de làctic i temps de duplicació, o pel càlcul d'altres paràmetres, com per exemple el mòdul d'elasticitat dels polímers que s'han provat, i per l'avaluació macro i microscòpica de la regeneració de cartílag en els animals *in vivo*. El software utilitzat per realitzar aquests càlculs ha estat el Microsoft Excel® 7. En algun dels casos, per a una millor comprensió dels resultats, ha resultat interessant indicar la metodologia de càlcul en l'apartat corresponent o bé en un altre apartat dins d'aquest capítol de materials i mètodes.

7.8.1 Avaluació de la regeneració de cartílag articular hialí.

Per a l'avaluació de la regeneració del cartílag hialí, s'ha realitzat un estudi de tipus doble cec, amb la participació de diferents especialistes. L'avaluació macroscòpica l'han realitzada metges especialistes en traumatologia i la microscòpica, metges i veterinaris especialistes en anatomia patològica.

Per avaluar el grau de reparació del cartílag articular a nivell macroscòpic, s'han utilitzat dos sistemes de gradació: un elaborat per Oswestry i col·laboradors (van den Borne et al. 2007) i l'altre elaborat per Brittberg i Peterson (van den Borne et al. 2007) anomenat, escala ICRS (International Cartilage Repair Society). Un cop els animals són eutanasiats, s'han realitzat artrotomies per mostrar les articulacions i valorar la regeneració del cartílag articular a nivell macroscòpic de forma independent en base als paràmetres establerts a la taula 7.9. i 7.10.

Taula 7.9. Sistema d'avaluació macroscòpica de la *Internacional Cartilage Repair Society* (ICRS) elaborat per Brittberg i Peterson (van den Borne et al. 2007).

VALORACIÓ MACROSCÒPICA REGENERACIÓ CARTÍLAG	Qualificació	Punts
Grau de reparació del defecte	Anivellat amb el cartílag adjacent	4
	75% de la lesió reparada	3
	50% de la lesió reparada	2
	25% de la lesió reparada	1
	0% de la lesió reparada	0
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	Completa	4

	<1mm de separació	3
	>1mm de separació+75% de	2
	>1mm de separació+50% de	1
	25% de contacte o sense	0
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	Suau	4
	Superfície fibril·lada	3
	Algunes fissures	2
	Moltes fissures	1
	Gran degeneració	0

Taula 7.10. Sistema d'avaluació macroscòpica elaborat per Oswestry i col·laboradors (van den Borne et al. 2007).

VALORACIÓ MACROSCÒPICA REGENERACIÓ CARTÍLAG	Qualificació	Punts
Aparença de la membrana sinovial	Normal	0
	Lleugerament inflamada	1
	Inflamada edematosa	2
	Molt inflamada i engruixuda	3
	Pannus sinovial	4
Aparença del cartílag		
Nivell del teixit de reparació respecte a la superfície articular	Anivellat	2
	Elevat	1
	Enfonçat	0
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	Completa	2
	Incompleta <25%	1
	Incompleta >25%	0
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	Suau	2
	Irregular (lleugerament)	1
	Irregular (fibril·lació)	0
Color de la zona	Perlat	2
	Blanc	1
	Groc	0
Rigidesa al tacte	Normal (com el cartílag)	2
	Suau	1
	Molt suau	0

Per avaluar el grau de reparació del cartílag articular a nivell microscòpic, s'han utilitzat dos sistemes de gradació: un elaborat per la *Internacional Cartilage Repair Society* (ICRS) (Mainil-Varlet et al. 2003) (taula 7.10) i l'altre elaborat per Mainil-Varlet i col·laboradors (Mainil-Varlet et al.

2001) (taula 7.9). Els sistemes estan basats en la valoració histològica independent dels paràmetres que es llisten a les taules 7.11. i 7.12.

Taula 7.11. Sistema de gradació histològica de la regeneració de cartílag articular elaborat per Mainil-Varlet i col·laboradors (Mainil-Varlet et al. 2001).

VALORACIÓ MICROSCÒPICA REGENERACIÓ CARTÍLAG	Qualificació	Punts
Morfologia del teixit	Majoritàriament cartílag hialí	3
	Majoritàriament fibrocartílag	2
	Majoritàriament fibrós	1
	Fibrós	0
Tinció de la matriu (Safranina O)	Normal	3
	Moderada	2
	Lleugera	1
	Absent	0
Integritat estructural	Normal	4
	Organització columnar	3
	Sense organització	2
	Cavitats cístiques o disrupcions	1
Clústers de condrocits	Desintegració severa	0
	Sense clústers	2
	<25% de les cèl·lules	1
	25-100% de les cèl·lules	0
Formació de la línia de marea	Completa	4
	76-90%	3
	50-75%	2
	25-49%	1
	<25%	0
Formació de l'os subcondral	Bona	2
	Regular	1
	Sense formació	0
Estructura de la superfície	Normal	3
	Alguna irregularitat	2
	Fibril·lació moderada	1
	Molt fibril·lada	0
Emplenat del defecte	91-110%	4
	76-90%	3
	51-75%	2
	26-50%	1
	<25%	0
Integració lateral	Integrat per tots els costats	2

	Integrat per algun dels costats	1
	No integrat	0
Integració basal	91-100%	3
	70-90%	2
	50-70%	1
	<50%	0
Inflamació	Sense inflamació	4
	Lleugera inflamació	2
	Molta inflamació	0

Taula 7.12. Sistema de gradació histològica de la regeneració de cartílag articular elaborat per la *Internacional Cartilage Repair Society (ICRS)* (Mainil-Varlet et al. 2003).

VALORACIÓ MICROSCÒPICA REGENERACIÓ		
CARTÍLAG	Qualificació	Punts
Superfície	Llisa/Continua	3
	Discontinuitats/Irregularitats	0
Matriu	Hialina	3
	Mixta hialina/Fibrocartílag	2
	Fibrocartílag	1
	Teixit fibrós	0
Distribució cel·lular	Columnar	3
	Mixta/Columnar-grups	2
	Grups	1
	Individuals/Desorganitzat	0
Viabilitat població cel·lular	Predominantment viable	3
	Parcialment viable	2
	<10% viable	1
Os subcondral	Normal	3
	Augmentat/Remodelat	2
	Necrosis òssia/Teixit de granulació	1
	Desunió/Fractura	0
Mineralització del cartílag(cartílag calcificat)	Normal	3
	Anormal/Localització inapropiada	0

Taula 7.13. Sistema de valoració del contingut de proteoglicans i col·lagen tipus II recomanat per la Hollander i col·laboradors (Hollander et al. 1995).

VALORACIÓ TINCIONS REGENERACIÓ		
CARTÍLAG	Qualificació	Punts
Safranina O	Normal	4
	Lleugera reducció	3
	Moderada reducció	2

	Greu reducció	1
	No tenyida	0
Col·lagen tipus II	Tota la matriu amb pèrdua en la superfície	4
	Superficial difús i pericel·lular en la part mitja i	3
	Superficial difús i pericel·lular en la part mitja	2
	Restringida a la zona superficial	1
	Pericel·lular	0,5
	No tenyit	0

De cada mostra s'ha valorat la zona central de la lesió, els marges d'integració al cartílag i a l'os subcondral normal adjacent. Per valorar la quantitat de proteoglicans en la matriu del cartílag articular s'ha realitzat en funció dels resultats obtinguts amb la tinció de Safranina O, específica per a proteoglicans, i per a valorar el contingut en col·lagen tipus II, s'ha realitzat en funció dels resultats obtinguts amb la immunohistoquímica per a col·lagen tipus II, seguint la gradació recomanada per Hollander i col·laboradors (Hollander et al. 1995). Els dos paràmetres queden resumits a la taula 7.13.

7.8.2 Velocitat màxima de creixement i temps de duplicació.

En la fase de creixement exponencial d'un cultiu cel·lular, on la velocitat de creixement és constant i igual a la màxima velocitat de creixement a la que pot créixer el cultiu, la relació entre la concentració cel·lular i el temps de cultiu es pot expressar amb les fórmules següents (l'equació 7.6 i l'equació 7.7, on s'han aplicat el logaritme neperià a cada costat de l'equació 7.6).

$$C_c = C_{c_0} \cdot \exp(\mu_{m\grave{a}x} \cdot t) \quad \text{Equació 7.6}$$

$$\ln(C_c) = \mu_{m\grave{a}x} \cdot t + \ln(C_{c_0}) \quad \text{Equació 7.7}$$

on

C_c és la concentració cel·lular (C_{c_0} indica la concentració cel·lular inicial).

$\mu_{m\grave{a}x}$ és la màxima velocitat de creixement pel cultiu en qüestió.

t és el temps de cultiu.

Per tant, l'obtenció de la velocitat màxima de creixement es pot realitzar de dues maneres diferents. Per una banda, a partir de la representació de la concentració cel·lular en front el temps de cultiu (figura 3, eix de l'esquerra) es pot efectuar un ajust exponencial en la zona de creixement exponencial (equació 7.6), descartant els punts inicials que es troben en fase de latència i els punts finals en el que el cultiu ja es troba limitat (en ambdós casos el cultiu no creix a la màxima velocitat de creixement i, per tant, no interessen).

Per altra banda, la realització d'un ajust exponencial no és sempre possible realitzar-la, de manera que, representant els valors del logaritme neperià de la concentració cel·lular respecte el temps de cultiu (figura 7.3., eix de la dreta), es pot obtenir el valor de la velocitat màxima de creixement a partir d'un ajust lineal de les dades (equació 7.7). Altra vegada, cal descartar tant els punts inicials que es troben en fase de latència com els punts finals en el que el cultiu ja es troba limitat.

A la figura 7.3, es mostra un exemple de càlcul de la velocitat màxima de creixement en un cultiu de cèl·lules CMMA per a ambdues metodologies.

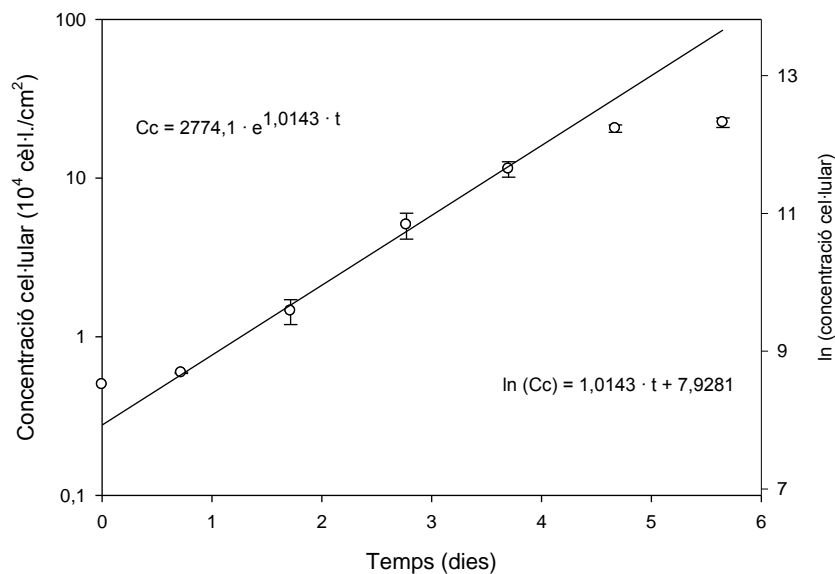


Figura 7.3 Exemple de càlcul de la velocitat màxima de creixement per un cultiu de CMMA, a partir d'un ajust exponencial directament de les dades de concentració cel·lular (eix i fórmula de l'esquerra) o a partir d'un ajust lineal de les dades del logaritme neperià de les mesures de concentració cel·lular (eix i fórmula de la dreta).

En ambdós casos, s'obté el mateix valor de la màxima velocitat de creixement que, per a aquest cas, és de 1,0143 d⁻¹. Tot i ser un dels paràmetres més importants a obtenir per un cultiu

cel·lular, per a poder-nos fer una idea del que representa, és recomanable el càlcul del temps de duplicació corresponent, que és el temps que tarda el cultiu en doblar un cop la concentració cel·lular, i es pot calcular a partir de l'equació 7.8. En aquest exemple, el temps de duplicació corresponent a una velocitat de 1,0143 d⁻¹, equival a 0,68 dies (16,4 hores).

$$t_{dup} = \frac{\ln(2)}{\mu_{m\grave{a}x}} \quad \text{Equació 7.8}$$

on

t_{dup} és el temps de duplicació.

$\mu_{m\grave{a}x}$ és la màxima velocitat de creixement pel cultiu en qüestió.

7.8.3 Velocitats específiques de consum i producció de metabòlits

Per tal de calcular les velocitats específiques de consum de glucosa i de producció d'àcid làctic en cultius de cèl·lules animals, s'utilitzen les següents equacions (equacions 7.9 i 7.10), provinents dels balanços de substrats i productes en cultius animals.

$$\Delta S = -q_s \cdot ICV \quad \text{Equació 7.9}$$

$$\Delta P = q_p \cdot ICV \quad \text{Equació 7.10}$$

on:

ΔS és el consum acumulat de glucosa (mesurada en μmols),

ΔP és la producció acumulada d'àcid làctic (mesurada en μmols),

ICV és la integral de cèl·lules viables (mesurada en $1\text{E}+06$ cèl·lules \cdot dia), que es calcula de la següent manera:

$$ICV_n = \int_0^n X_v t = \sum_{i=0}^{n-1} [X_{vm,i} \cdot (t_{i+1} - t_i)] \quad \text{Equació. 7.11}$$

on

$X_{vm,i}$ és la mitjana de les cèl·lules viables en interval de temps entre t_{i+1} i t_i .

Per tant, a partir de la representació dels consums acumulats de glucosa i de làctic respecte la integral de cèl·lules viables al llarg d'un cultiu cel·lular, es podran obtenir les velocitats específiques, tant de consum de glucosa com de producció de làctic, mesurades en μmols

/(1E+06 cèl·lules · dia). A la figura 7.4 es poden observar les gràfiques de consum de glucosa (esquerra) i de producció de làctic (dreta) respecte la integral de cèl·lules viables per a un dels cultius analitzats al llarg del treball. Amb els pendents de les rectes obtingudes ja s'obté els valors de q_s i q_p de les equacions 7.9 i 7.10.

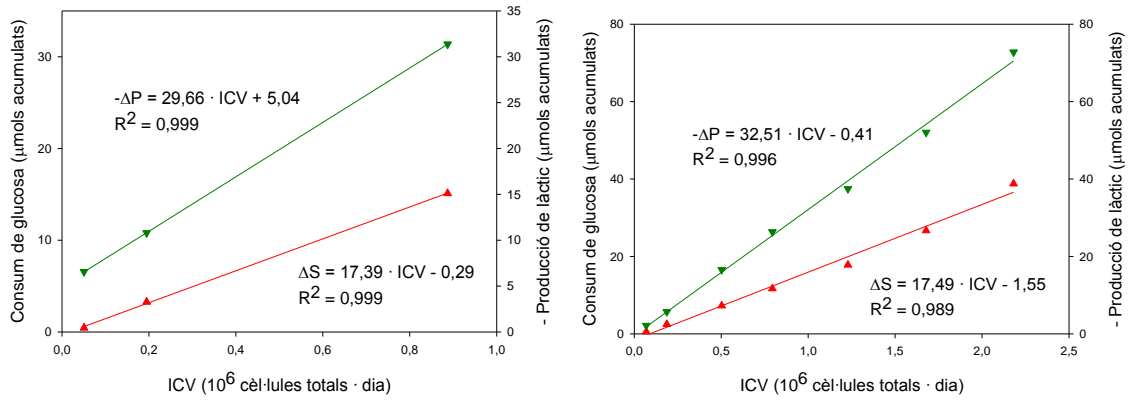


Figura 7.4. Velocitats específiques de consum i producció de metabolits per les CMMA en medi DMEM + 10 % sèrum AB. Esquerra CMMA de cartílag hialí, dreta CMMA de moll d'os.

7.9. Bibliografia

- Barnes, D., et al. (1980). "Methods for growth of cultured cells in serum free medium." Analytical Biochemistry **102**: 255-270.
- Caminal, M. (2006). Estudi d'optimització de la font cel·lular i el suport per a la regeneració de cartílag hialí, Master-Tesis.
- Glassy, M., et al. (1988). "Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production." Biotechnology and Bioengineering **32**: 1015-1028.
- Hollander, A. P., et al. (1995). "Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration." Journal of Clinical Investigation **96**(6): 2859.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2003). "Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 45.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2001). "Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study." Osteoarthritis and Cartilage **9**: S6-S15.
- Maurer (1986). Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. Oxford, IRL Press.
- Papoutsakis, E. (1991). "Media additives for protecting freely suspended animal cells against agitation and aeration damage." Trends in Biotechnology **9**: 316-324.
- Shacter, E. (1989). "Serum-free media for bulk culture of hibridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies." Trends in Biotechnology **7**: 248-253.
- van den Borne, M. P. J., et al. (2007). "International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture1." Osteoarthritis and Cartilage **15**(12): 1397-1402.

CAPÍTOL 8

ANNEXOS

8.1. Valoracions histològiques i macroscòpiques.

A continuació es mostren les valoracions histològiques i macroscòpiques realitzades per a l'avaluació de l'experiment pilot del capítol 4.

Taula 8.1. Puntuacions de l'avaluació histològica realitzada pel Dr. Fàbregas, Metge especialista anatomopatòleg. En aquest cas s'ha utilitzat l'escala elaborat per Mainil-Varlet i col·laboradors (Mainil-Varlet et al. 2001).

Valoració Cartílag	F6 GD	F6 GE	F12 D	F14 GD	F14 GE	F16 GD	F16 GE	F17 GD	F17 GE	F30 GD	F30 GE
Morfologia del teixit	3	1	3	1	2	2	1	3	1	3	3
Tinció de la matriu (Safranina O)	3	1	0	1	2	2	1	3	1	2	2
Integritat estructural	2	2	1	0	2	3	2	2	3	2	2
Clústers de condrocits	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Os subcondral	1	1	0	1	1	2	0	2	0	2	1
Formació de la línia de marea	0	0	0	0	0	3	0	2	0	3	0
Formació de l'os subcondral	1	1	0	1	1	2	0	2	0	2	1
Estructura de la superfície	1	0	1	0	2	2	1	2	0	2	3
Emplenat del defecte	3	1	3	0	4	3	1	4	1	2	2

Integració lateral	2	1	0	1	1	1	2	1	0	1	2
Integració basal	3	3	0	0	3	3	0	3	0	3	2
Inflamació	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Taula 8.2. Puntuacions de l'avaluació macroscòpica realitzada pel Dr. Fàbregas, Metge especialista anatomopatòleg. En aquest cas s'ha utilitzat l'escala ICRS (van den Borne et al. 2007).

Valoració Cartílag	F6 GD	F6 GE	F1 2D	F12 GE	F14 GD	F14 GE	F16 GD	F16 GE	F17 GD	F17 GE	F30 GD	F30 GE
Grau de reparació del defecte	3	2	3	2	1	2	3	2	4	1	2	1
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	4	4	0	4	1	4	4	4	4	1	4	1
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	3	3	3	3	2	3	1	3	3	3	3	3

Seguidament es mostren les valoracions histològiques i macroscòpiques realitzades per a l'avaluació de l'assaig preclínic del capítol 5.

Taula 8.3. Puntuacions de l'avaluació histològica realitzada per la Dra. Rabanal, Veterinària especialista anatomatòloga. En aquest cas s'ha utilitzat l'escala ICRS (Mainil-Varlet et al. 2003).

Valoració Cartílag	Animals											
	F63				F57				F58			
	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
Superfície	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Matriu	0	2	2	0	1	3	0	3	3	0	3	2
Distribució cel·lular	0	0	0	0	0	2	1	2	3	0	3	2
Viabilitat població cel·lular	2	3	2	0	3	3	3	3	3	2	3	3
Os subcondral	1	0	0	2	0	0	0	0	1	2	2/0	0
Mineralització del cartílag(cartílag calcificat)	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0

Valoració Cartílag	Animals															
	F59				F44				F61				F52			
	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
Superfície	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0
Matriu	3	3	2	2	3	3	3	2	3	3	2	2	1	2	2	3
Distribució cel·lular	2	2	2	1	2	2	0	0	2	2	3	2	0	2	0	2
Viabilitat població cel·lular	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
Os subcondral	0	0	2	2/0	0	2	2	2	3	3	2	0	3	2/0	2	2/0
Mineralització del cartílag(cartílag calcificat)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	3	0

Taula 8.4. Puntuacions de l'avaluació macroscòpica realitzada per els següents especialistes: Dr. Barrachina, Metge especialista traumatòleg (Avaluador A), Dr. García, Cirurgia veterinari (Avaluador B), Llic. Carla Fonseca, veterinaria (Avaluador C). En aquest cas s'ha utilitzat l'escala Oswestry (van den Borne et al. 2007).

AVALUADOR A	Animals											
	F63				F57				F58			
	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
Valoració Cartílag												
Aparença de la membrana sinovial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nivell del teixit de reparació respecte a la superfície articular	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	1	1	2	1	2	0	2	0	1	0	0	1
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	0	2	1	0	1	0	1	0	2	1	1	2
Color de la zona	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2
Rigidesa al tacte	2	1	2	1	2	0	2	0	2	1	2	2

AVALUADOR B	Animals											
	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
	Valoració Cartílag											
Aparença de la membrana sinovial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nivell del teixit de reparació respecte a la superfície articular	0	2	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	1	2	2	1	2	0	2	0	2	0	1	0
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2
Color de la zona	0	2	2	0	2	1	2	1	1	1	1	2
Rigidesa al tacte	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1

AVALUADOR C

	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
Valoració Cartílag												
Aparença de la membrana sinovial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nivell del teixit de reparació respecte a la superfície articular	0	1	2	0	2	0	2	0	0	0	0	2
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	1
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	1	2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	2
Color de la zona	1	2	2	1	2	0	2	0	0	0	0	2
Rigidesa al tacte	1	2	2	1	1	0	1	0	1	1	1	2

Animals

AVALUADOR A

	F59				F44				F61				F52			
	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD	CLE	CME	CLD	CMD
Valoració Cartílag																
Aparença de la membrana sinovial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nivell del teixit de reparació respecte a la superfície articular	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	0	2	0
Integració de zona lesionada-reparada amb el cartílag adjacent	0	1	1	1	1	1	1	0	2	2	2	2	2	1	1	1
Aparença macroscòpica del teixit de reparació	1	1	1	1	1	1	1	0	2	2	2	2	2	0	2	2
Color de la zona	2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2
Rigidesa al tacte	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1

8.2. Bibliografia.

- Mainil-Varlet, P., et al. (2003). "Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS)." The Journal of Bone and Joint Surgery **85**(Supplement 2): 45.
- Mainil-Varlet, P., et al. (2001). "Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study." Osteoarthritis and Cartilage **9**: S6-S15.
- van den Borne, M. P. J., et al. (2007). "International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture1." Osteoarthritis and Cartilage **15**(12): 1397-1402.